

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Molekularbiologie

**Wachstumsverhalten von ektopem humanem Endometrium unter
besonderer Berücksichtigung der Häm- und Lymphangiogenese nach
Transplantation in Mäusestämme mit unterschiedlicher adaptiver
Immundefizienz**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung eines Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät der
Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Linda Söhngen
aus Duisburg

2010

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting
1. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. R. Grümmer
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. S. Kasimir-Bauer

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juni 2010

Linda Söhngen, Markus Schmidt, Rainer Kimmig, Elke Winterhager, Ruth Grümmer: Growth characteristics and angiogenesis of human endometrium after subcutaneous and intraperitoneal implantation in Rag-1-Knockout- and Nude mice. 23. Arbeitstagung der Deutschen Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, 27.-29. September 2006 (Poster).

L. Söhngen, M.Schmidt, R.Kimmig, E.Winterhager, R.Grümmer:

Angiogenese und Lymphangiogenese in humanen ektopischen endometrialen Läsionen in immundefizienten Mausmodellen.

8. Arbeitskreistreffen Molekularbiologie, Deutsche Gesellschaft für gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF), Essen, 29.-30.August 2008 (Vortrag).

Linda Söhngen, Markus Schmidt, Carsten Böing, Rainer Kimmig, Elke Winterhager, Ruth Grümmer:

Angiogenesis and lymphangiogenesis in ectopic human endometrial lesions in mouse models of endometriosis. 5th International Conference on the Female Reproductive Tract, Fraueninsel Chiemsee Bayern, 15.-18.Mai 2009 (Poster).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Endometriose	6
1.1.1	Definition und Pathogenese	6
1.1.2	Symptomatik, Diagnostik und Therapiemöglichkeiten	9
1.2	Angiogenese im Endometrium und bei Endometriose	11
1.2.1	Grundlagen der Hämangiogenese	11
1.2.2	Hämangiogenese im Endometrium und bei Endometriose	13
1.2.3	Grundlagen der Lymphangiogenese	15
1.2.4	Lymphangiogenese im Endometrium und bei Endometriose	16
1.3	Experimentelle Modelle in der Endometriose	17
1.3.1	In-vitro Modell	17
1.3.2	Autologe Tiermodelle	18
1.3.3	Heterologe Mausmodelle	19
2	Materialien und Methoden	22
2.1	Humanes Endometrium	22
2.2	Versuchstiere	22
2.2.1	Züchtung und Genotypisierung von Rag-1 ^{-/-} -Mäusen	23
2.2.1.1	DNA Isolation	23
2.2.1.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	24
2.2.1.3	Gel-Elektrophorese	25
2.3	Transplantation des humanem Endometrium-Gewebes	26
2.4	Entnahme der Endometriumsherde	27
2.5	Histologie	27
2.5.1	Immunhistochemie	27
2.6	Statistische Auswertung	29
2.7	Chemikalien und Lösungen	30
2.7.1	Chemikalien	30
2.7.2	Zusammensetzung der Lösungen	31

3	Ergebnisse	34
3.1	Wiederfindungsraten von subkutan und intraperitoneal implantiertem Endometrium	34
3.2	Größe der ektopen Endometriumsherde	37
3.3	Morphologie des humanen endometrialen Gewebes nach Kultur in Rag-1 ^{-/-} und Nacktmäusen	38
3.4	Angiogenese in ektopen endometrialen Läsionen	40
3.4.1	Hämangiogenese	40
3.4.2	Lymphangiogenese	46
4	Diskussion	50
4.1	Persistenz und Morphologie der ektopen endometrialen Läsionen	50
4.2	Hämangiogenese in den ektopen Läsionen	56
4.3	Lymphangiogenese in den ektopen Läsionen	60
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis	64
7	Anhang	77
7.1	Abbildungsverzeichnis	77
7.1	Abkürzungsverzeichnis	80
8	Danksagung	81
9	Lebenslauf	83

1 Einleitung

1.1 Endometriose

1.1.1 Definition und Pathogenese

Die Endometriose ist eine Östrogen-abhängige Erkrankung (Dizerega et al., 1980; Giudice und Kao, 2004), die durch das Auftreten von endometrialen Zellverbänden außerhalb des Cavum uteri charakterisiert ist. Mit einer Prävalenz von 10 bis 25 Prozent (McLaren und Prentice, 1996; Moghissi, 1999) unter den Frauen im reproduktionsfähigen Alter gehört sie zu den häufigsten benignen gynäkologischen Erkrankungen weltweit. In Deutschland liegt die jährliche Inzidenz bei etwa 40.000 (Schweppe et al., 2003). Bei der Endometriose werden verschiedene Schweregrade nach der „Revised American Society for Reproductive Medicine for Endometriosis“ (American Society for Reproductive Medicine ARSM, 1996) differenziert und diese entsprechend in vier Stadien (I-gering, II-mäßig, III-schwer, IV-ausgedehnt) eingeteilt. Dabei werden die peritoneale, ovarielle und rektovaginale oder tief infiltrierende Endometriose (Donnez et al., 1996) unterschieden, wobei die peritoneale Endometriose die häufigste Form darstellt (Shaw et al., 1993). Auf Grund ihrer unterschiedlichen Lokalisation, ihrer Pathogenese und ihrem Ansprechen auf hormonelle Therapien (Nisolle et al., 1993) ist eine Differenzierung zwischen ihnen möglich. Der genaue Pathomechanismus der Erkrankung ist bis heute nicht geklärt, jedoch existieren verschiedene Theorien zu ihrer Entstehung. Die anerkannteste Theorie für die Entstehung der peritonealen Endometriose ist die Implantationstheorie von Sampson (1927). Hierbei gelangt endometriales Gewebe durch retrograde Menstruation (Abb. 1A), welche physiologischerweise bei menstruierenden Frauen auftritt (Halme et al., 1984) in die Bauchhöhle, in der es an das Peritoneum adhäriert und in das umliegende Gewebe invadiert (Abb. 1B und C). Interessanterweise führt die retrograde Menstruation aber nur bei einem Teil der Frauen zu der Ausbildung der Endometriose.

Hierbei spielen zum einen inflammatorische Reaktionen eine Rolle, was durch den Nachweis einer erhöhten Konzentration an aktivierten Makrophagen, Zytokinen, sowie T- und B- Zellen in der Peritonealflüssigkeit im eutopen Endometrium sowie in den ektopen endometrialen Herden betroffener Frauen belegt werden konnte (D'Hooghe et al., 1996 und 2003; Berkkanoglou et al., 2003). Zum anderen kann auch das jeweilige eutope Endometrium verschiedene Eigenschaften aufweisen wie eine unterschiedliche Expression von Zell-Adhäsions-Molekülen (Foidart et al., 1993) oder Matrix-Metallo- Proteinase (Korkorine et al., 1997), die für die Adhäsion der endometrialen Zellen am Peritoneum der Beckenorgane und der Bauchwand sowie die folgende Invasion in das Gewebe notwendig sind. In in-vitro Studien konnte außerdem eine ausgeprägte Invasivität endometriotischer Zellen nachgewiesen werden (Wingfield et al., 1995; Jolicoeur et al., 1998; Leyendecker et al., 1998). Bei der peritonealen Endometriose werden verschiedene Läsionstypen nach ihrem zeitlichen Auftreten, ihrer Aktivität sowie ihrer vaskulären Beschaffenheit differenziert (American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Medicine classification of Endometriosis, 1997). Dabei weisen die früh auftretenden roten Läsionen die höchste proliferative und sezernierende Aktivität auf (Donnez et al., 1994). Sie sind durch eine hohe Mitoserate sowie durch die Expression von Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und Proteasen gekennzeichnet und sind durch ein gut ausgebildetes kapilläres Netzwerk charakterisiert. Weniger aktiv und vaskularisiert sind die braun-schwarzen Läsionen (Schweppe, 2002). Auf Grund ihrer fehlenden mitotischen Aktivität sowie mangelnden Vaskularisierung repräsentieren die weißen Läsionen das Ruhestadium der Erkrankung (Nisolle et al., 1993).

Die tief infiltrierende rektovaginale Form der Endometriose basiert nicht auf der Implantationstheorie des retrograd abgeschiedenen Menstruationsgewebes, sondern wird als Metaplasie von Überresten des Müller-Ganges verstanden. Dabei penetriert das metaplastisch umgewandelte Zölomepithel in das rektovaginale Septum und schafft durch eine verstärkte Proliferation glatter Muskelzellen ein adenomyomatöses Erscheinen (Donnez et al., 1990 und 1996).

Als weitere mögliche Entstehungsursache wird das Archimettrakonzept diskutiert, das durch eine uterine Hyperperistaltik charakterisiert ist (Leyendecker et al., 1998). In seltenen Fällen (ca. 1 %) kann eine Endometriose zu einer malignen Entartung führen (Ulrich et al., 2005).

Die verschiedenen Erscheinungsformen der Endometriose sowie ihre zahlreichen möglichen pathogenetischen Mechanismen lassen keine einheitliche Ätiologie vermuten und müssen differenziert betrachtet werden.

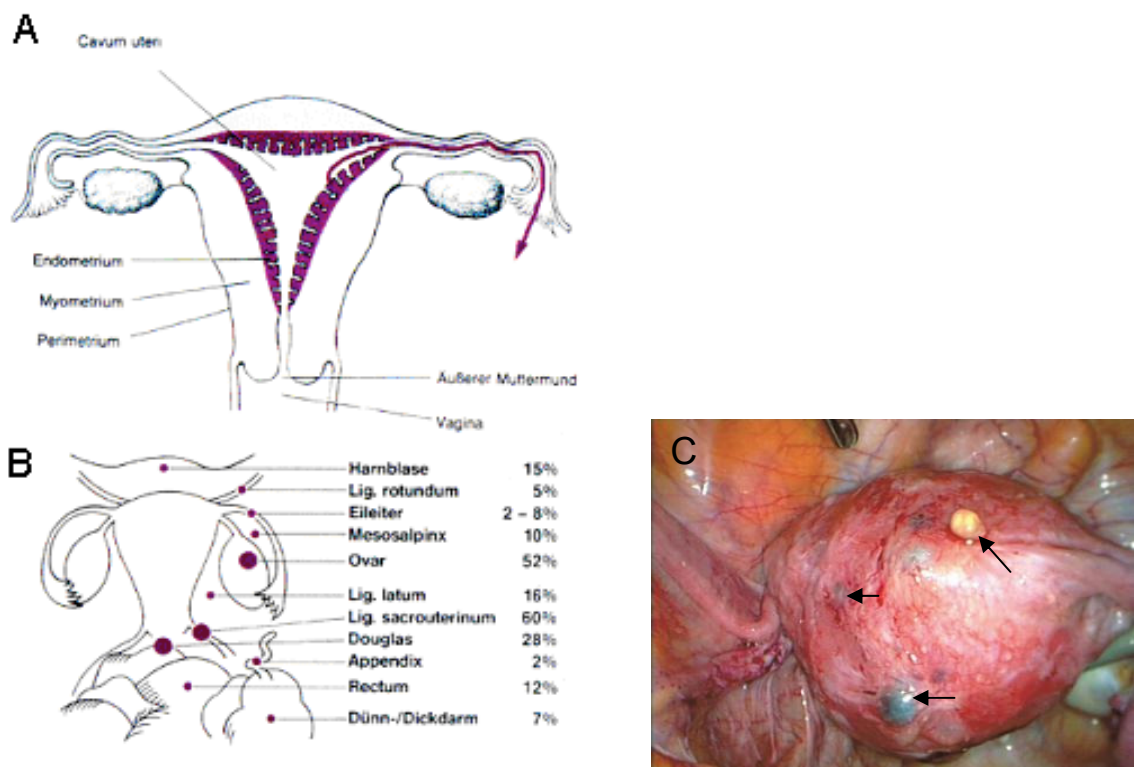


Abbildung 1:

A: Schematische Darstellung der retrograden Menstruation (Pfeil).

B: Endometriotische Läsionen und ihre Häufigkeit innerhalb der Peritonealhöhle (Schweppe, 1989).

C: Laparoskopische Darstellung von peritonealen Endometrioseherden (Pfeile) (http://www.frauenheilkund.insel.ch/uploads/pics/peritoneal_klein.jpg).

1.1.2 Symptomatik, Diagnostik und Therapiemöglichkeiten

Die Symptomatik der Endometriose ist von verschiedenen Faktoren abhängig und kann sich sehr individuell äußern. Auf Grund der teilweise schwerwiegenden Auswirkungen kann sie die Lebensqualität der Patientin erheblich reduzieren. Am häufigsten beklagen die Patientinnen Unterbauchschmerzen, die sich in Form von starken Dysmenorrhoeen darstellen, aber auch zyklusunabhängig sein können und im schwersten Fall dauerhaft bestehen. 40 bis 60 % der Patientinnen mit Dysmenorrhoeen weisen ursächlich eine Endometriose auf (Farquhar, 2000). Weitere Beschwerden beinhalten die Dyspareunie und die Subfertilität. Letztere besteht bei ca. 60 % der Erkrankten (Ledger, 1999), des weiteren wurde bei 30 bis 50 % der Patientinnen mit unerfülltem Kinderwunsch eine Endometriose diagnostiziert (Grupo italiano, 1994). In selteneren Fällen wird über eine Dysurie, Dyschezie sowie zyklusabhängige rektale Blutungen und Hämoptoe berichtet. Eine Korrelation der Schwere der Symptomatik mit dem Ausprägungsgrad, der Lokalisation und der Aktivität der ektopen endometrialen Herde scheint allerdings nicht zu bestehen (Vercellini et al., 2007).

Die Diagnostik der Endometriose ist sicher nur durch eine Laparoskopie möglich (Ulrich et al., 2005), bei der endometriale Herde direkt diagnostiziert und je nach Lage sofort entfernt und später histologisch bestätigt werden können (Abbott et al., 2004). Damit stellt diese minimal invasive Technik gleichzeitig eine therapeutische Option dar. Da die Rezidivrate der Erkrankung sehr hoch ist, werden betroffene Patientinnen diesem Verfahren in vielen Fällen wiederholt unterzogen. Dadurch ergibt sich eine hohe Belastung für die Patientinnen sowie ein erhöhtes Risiko von Adhäsionen nach mehrfachen operativen Eingriffen.

Um die Ausdehnung der Endometriose beurteilen zu können, kommen zudem die Sonographie sowie die Magnetresonanztomographie zum Einsatz.

Auf Grund der häufig fehlenden Kenntnisse dieser Erkrankung auch bei Ärzten sowie der limitierten diagnostischen Möglichkeiten erfolgt eine definitive Diagnosestellung und damit der Behandlungsbeginn meist erst nach durchschnittlich sechs jährigem Bestehen der Erkrankung (Schweppe, 2003).

Bis heute ist allerdings auf Grund der ungeklärten Pathogenese keine adäquate Therapie etabliert und somit noch keine Heilung zu erzielen. Ebenso ist auch eine Primärprävention der Endometriose nicht möglich. Die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich demnach auf eine maximale Reduzierung der Symptomatik, bei möglichst geringen Nebenwirkungen und einem Zugewinn an Lebensqualität. In dieser Hinsicht ist eine Kombination von bereits erwähnter operativer Entfernung der Herde mit einer medikamentösen Therapie anzustreben. Angewandte Pharmazeutika sind Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) sowie Cyclo-Oxygenase-2-Hemmer (COX-2-Hemmer). Sie bewirken eine Hemmung der Prostaglandinsynthese und blockieren somit die Schmerz- und Entzündungskaskade. Mögliche Nebenwirkungen sind gastrointestinale Blutungen (NSAID) sowie Myokardinfarkte (COX-2).

Auf Grund der Hormonabhängigkeit der Endometriose ist die endokrine Behandlung die wichtigste medikamentöse Therapieoption. Sie basiert vor allem auf dem Entzug der ovariellen Östrogene zur Erzielung eines hypoöstrogenen Status (Lapp, 2000). Zum Einsatz kommen Gestagene (Progestine), orale Kontrazeptiva sowie GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormon)-Agonisten. Die Einnahme dieser Steroidhormone interferiert mit der hypothalamo-hypophysär-ovariellen Achse und bewirkt über einen negativen Feedback-Mechanismus letztendlich eine Suppression der endogenen ovariellen Hormonsynthese. Dabei sorgen Gestagene für eine sekretorische Transformation des Endometriums und eine antinflammatorische Wirkung bei guter Verfügbarkeit und geringen Nebenwirkungen. Damit eignen sie sich für eine Langzeittherapie. Orale Kontrazeptiva führen zu einer Hemmung der ovariellen Steroidhormonsynthese und bewirken dadurch langfristig eine Resorption der endometrialen Herde und eine Amenorrhoe, bei ebenfalls geringen Nebenwirkungen.

Durch ihre direkte Blockierung der hypophysären Gonadotropinfreisetzung gelten GnRH-Analoga als sehr wirkungsvoll für die Therapie der Endometriose. Initial lösen sie einen Anstieg des FSH (Follikel-Stimulierendes Hormon) und des LH (Luteinisierendes Hormon) aus und erzielen damit den sogenannten „flare-up“

Effekt. Im weiteren Verlauf führt dies allerdings zu einem hypogonadotropen Hypoöstrogenismus. Die damit verbundenen klimakterischen Beschwerden werden durch die sogenannte „add back“-Therapie, bei welcher additiv Gestagene mit niedrigdosiertem Östrogen gegeben werden, reduziert.

GnRH-Antagonisten wie z. B. Cetrorelix blockieren dagegen direkt die FSH- und LH-Freisetzung und führen somit nicht zu einem initialen Anstieg dieser Hormone und zu geringeren Nebenwirkungen. Sie sind allerdings bisher für die Behandlung der Endometriose noch nicht zugelassen. Für die postmenopausale Endometriosetherapie, aber auch als Kombinationsmedikation für prämenopausale Patientinnen werden im Weiteren Aromatase-Hemmer diskutiert (Attar et al., 2006), die die Östrogensynthese in endometriotischen Herden reduzieren könnten, basierend auf der dort herrschenden Überexpression des Aromatase-Enzyms (Bulun et al., 2000). Bisher finden diese in Deutschland allerdings noch keine Zulassung.

Auf Grund der hohen Rezidivraten und der unerwünschten Nebenwirkungen der hormonellen Präparate in der Endometriosetherapie ist die Entwicklung neuer adäquater und spezifischerer Therapeutika wünschenswert. Ein möglicher Ansatzpunkt hierfür ist die selektive Beeinflussung der endometriotischen Angiogenese, die im folgenden Abschnitt genauer erläutert werden soll.

1.2 Angiogenese im Endometrium und bei Endometriose

1.2.1 Grundlagen der Hämangiogenese

Unter Angiogenese versteht man den Prozess der Blutgefäßneubildung, ausgehend von bereits existierenden Gefäßen. Sie unterscheidet sich von der spontanen Gefäßbildung, der Vaskulogenese, die von Endothel-Stammzellen, den Angioblasten, ausgeht und auf die Embryonalentwicklung beschränkt ist. Physiologischerweise tritt eine Angiogenese postnatal bei der Wundheilung sowie während des menstruellen Zyklus in den ovariellen Follikeln, im Corpus luteum

und im Endometrium auf (Findlay, 1986; Folkman, 1990; Gordon et al., 1995). Diese Prozesse unterliegen einer strengen Regulation, welche für kurze Perioden der Gefäßbildung sorgen und sie danach wieder inhibieren (Folkman und Shing, 1992). Darüber hinaus findet Angiogenese beim Adulten unter pathologischen Bedingungen statt wie z.B. bei der Tumorgenese, der diabetischen Retinopathie sowie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) (Folkman, 1990; Klagsbrun und D'Amore, 1991). Eine zentrale Rolle dabei spielt die Reaktion des erkrankten Gewebes und der Tumorzellen auf die lokale Ischämie und damit bestehende chronische Hypoxie, welche im Folgenden zu einer Expression Hypoxie-induzierbarer-Faktoren (HIF) und einer Proliferation vaskulärer Zellen führt. Tumorzellen sind weiterhin in der Lage eigene angiogene Faktoren wie den sauren und basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (FBF), Angiogenin, den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und den Tumornekrosefaktor(TNF)- α zu sezernieren (Oberholzer, 2001). Auch die Endometriose gehört zu den Angiogenese-abhängigen Erkrankungen (Gordon et al., 1995; Taylor et al., 2002).

Bei der Angiogenese unterscheidet man die Kapillaraussprossung bereits existierender Gefäße vom Splitting eines vorhandenen Gefäßes in zwei Gefäße (Folkman, 1995; Risau, 1997). Die Kapillaraussprossung wird getriggert durch verschiedene angiogene Faktoren, welche die Endothelzellrezeptoren auf bereits existierenden Gefäßen aktivieren. Dominierend dabei ist die endotheliale Expression von VEGF, Angiogenin und TNF- α . Im Folgenden werden Matrix-Metallo-Proteasen freigesetzt, die eine Degradation der Basalmembran verursachen und somit den Endothelzellen den Übertritt durch die Gefäßwand ermöglichen. Die Endothelzellen proliferieren daraufhin in die umgebende Matrix und formen solide Kapillaren, welche sich mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen und Integrinen mit Nachbargefäßen vernetzen. Nach Bildung einer eigenen Basalmembran ist die Gefäßneubildung abgeschlossen. Das Splitting beschreibt im eigentlichen Sinne eine Reorganisation bereits existierender Gefäße und beginnt mit einer Ausdehnung der Kapillarwand in ihr Gefäßlumen. Über die Bildung einer Kontaktzone und Verbindung der Endothelzellen beider Gefäßwände erfolgt eine Perforation der Gefäßmembran zum

Durchtritt verschiedener angiogener Wachstumsfaktoren und endothelialer Zellen ins Lumen. Im Folgenden wird der innere Teil des Gefäßes ausgebildet, welcher von Perizyten stabilisiert wird und später von Kollagen-Fibrillen durchsetzt wird um eine Extrazellulärmatrix für das Wachstum des Gefäßlumens zu bilden. Nach Abspaltung dieses Kernstückes ist abschließend ein singuläres Gefäß in zwei gespalten worden (Risau, 1997).

1.2.2 Hämangiogenese im Endometrium und bei Endometriose

Während des menstruellen Zyklus findet Angiogenese im Endometrium beim postmenstruellen Wiederaufbau sowie beim Längenwachstum der Gefäße von mittlerer zu später Proliferationsphase statt. In der mittleren bis späten Sekretionsphase wurde hingegen eine verminderte angiogene Aktivität detektiert (Rogers et al., 1992). Bisher konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Proliferation endometrialer Endothelzellen und der Zyklusphase gefunden werden (Girling und Rogers, 2005). Die endometriale Angiogenese unterliegt vor allem der Regulation durch Östrogen und Progesteron (Girling und Rogers, 2005). Rogers et al. (1992) konnten eine zyklusabhängige unterschiedliche angiogene Potenz des Endometriums beobachten. Dabei zeigte sich eine starke Zunahme der Gefäßbildung in der frühen Proliferationsphase, welche in der Zyklusmitte ihren maximalen Peak erreichte. Gegen Zyklusende ließ sich eine progressive Abschwächung der Angiogenese beobachten, welche während der Menstruationsphase signifikant reduziert war gegenüber allen anderen Stadien mit Ausnahme der späten Sekretionsphase. Eine andere Studie beschreibt eine signifikant stärkere Vaskularisierung des Endometriums in der frühen Proliferationsphase und in der frühen und späten Sekretionsphase im Vergleich zur späten Proliferationsphase (Maas et al., 2001).

VEGF gilt als fundamentaler proangiogener Faktor im Endometrium (Girling und Rogers, 2005). Auch wenn dessen Regulation bislang keine Östrogen- und/oder Progesteron-Abhängigkeit zeigte (Girling und Rogers, 2005) beobachteten Shweiki et

al. (1993) bereits eine erhöhte VEGF-Gen und -Proteinexpression in dem Östrogen-sensitiven Epithel während der Proliferationsphase. Des weiteren wurde eine 4 bis 5 mal höhere VEGF-mRNA Expression in der frühen Proliferationsphase im Vergleich zur späten Sekretionsphase gefunden (Torry und Torry, 1997). Durch den Nachweis ihrer VEGF-Konzentration wurden intravaskuläre, neutrophile Granulozyten als mögliche Stimulatoren der Angiogenese vermutet (Shweiki et al., 1993).

Grundlegend für das Wachstum und die Ausbildung der Spiralarterien wurde auch in der frühen Sekretionsphase eine deutlich erhöhte Expression angiogener Faktoren nachgewiesen (Maas et al., 2001). Neben der Abhängigkeit von einer neuen Kapillarbildung im Endometrium ist auch die Inhibition der endometrialen Angiogenese streng reguliert. So zeigten Iruela-Arispe et al. (1996) eine zyklusabhängige, progesteronregulierte Thrombospondin-1 Expression, von dem eine in-vivo und in-vitro Angiogenese-Suppression bekannt ist.

Eutopes Endometrium von an Endometriose erkrankten Frauen zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zum Endometrium nicht betroffener Frauen. So lässt sich eine erhöhte Endothelzell-Proliferation (Wingfield et al., 1995), mRNA- und Protein-Expression von Angiopoetin-1 (Ang-1) sowie eine erhöhte mRNA für Angiopoetin-2 (Hur et al., 2006) feststellen. Des weiteren wurden eine größere Mikro-Gefäßdichte sowie eine stärkere VEGF-A Expression im Drüsenepithel und eine stärkere VEGFR-2 Expression in den endometrialen Blutgefäßen gefunden (Bourlev et al., 2006). Für die Persistenz ektoper endometrialer Herde nach ihrer Adhäsion am Peritoneum ist eine ausreichende Blutversorgung obligat (Donnez et al., 1998; Taylor et al., 2002). Durch die Expression verschiedener angiogener Wachstumsfaktoren ist das endometriotische Gewebe in der Lage, eine Invasion peritonealer Gefäße zu induzieren.

Auf Grund dieser vom Peritoneum ausgehenden Vaskularisierung lassen sich die Herde bei laparoskopischen Eingriffen leicht detektieren (Abb. 2).

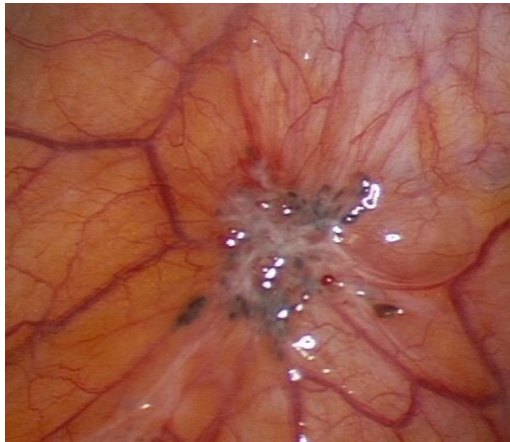


Abbildung 2:

Endometroide, von Blutgefäßen umgebene Läsion am Peritoneum (http://www.endogyn.de/db/img/atlas/endoatlas/pict_3870.jpg)

Weiterhin ist bekannt, dass die Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen eine hohe angiogene Potenz besitzt (Oosterlynck et al., 1993) und eine erhöhte Anzahl angiogener Faktoren aufweist (Koninckx et al., 1998), darunter spielt vor allem VEGF-A eine bedeutende Rolle (McLaren und Prentice et al., 1996). VEGF-Gen-Polymorphismen wurden kürzlich in Verbindung mit einem vermehrten Auftreten von Endometriose im Menschen nachgewiesen (Girling und Rogers, 2005). Welche Angiogenesemechanismen für die Vaskularisierung von endometriotischen Läsionen vorrangig sind, ist bisher unklar (Van Langendonckt et al., 2008).

Möglicherweise basieren auch die verschiedenen Formen der Endometriose, die auf Grund ihrer Ätiologie (Donnez et al., 1996) und lokalen Umgebung (Machado et al., 2008) differenziert werden können, auf unterschiedlichen angiogenetischen Mechanismen.

1.2.3 Grundlagen der Lymphangiogenese

Die Bildung der Lymphgefäße findet während der Embryonalentwicklung statt und nimmt ihren Ausgang vom embryonischen Kardinalvenensystem. Dabei exprimieren einige Regionen dieser Endothelzellen das Rezeptormolekül Prox-1, welches für die Differenzierung in Lymphgefäße verantwortlich ist. Im Verlauf kommen weitere charakteristische Oberflächenmoleküle wie Lyve-1, Podoplanin

und VEGFR-3 hinzu. Die genauen Signalmechanismen dieser Prozesse sind bisher noch nicht bekannt. Die selektiven Lymphgefäßmarker ermöglichen aber eine Detektierung verschiedener Schritte der Lymphangiogenese sowie deren Verteilung in Organen (Saharinen et al., 2004). Lymphgefäße sind charakterisiert durch blind beginnende Lymphkapillaren, die sich zu größeren dünnwandigen und durchlässigen Lymphgefäßen vereinen, welche die Lymphe ausschließlich unidirektional transportieren. Sie besitzen eine diskontinuierliche Basalmembran, die im Gegensatz zu Blutgefäßen nicht von Perizyten, bzw. glatten Muskelzellen umhüllt ist. Pathologischerweise spielt Lymphangiogenese bei inflammatorischen Prozessen, in der Wundheilung, bei der Ausbildung von Lymphödemen sowie bei Krebserkrankungen eine wichtige Rolle. Die Metastasierung verschiedener Malignome erfolgt dabei sowohl über bereits vorhandene Lymphgefäße sowie auch über eine Neubildung lymphatischer Gefäße.

1.2.4 Lymphangiogenese im Endometrium und bei Endometriose

Lymphatische Eigenschaften des Endometriums sind bisher unzureichend untersucht worden. Bisher durchgeführte Studien zeigten unterschiedliche Ergebnisse im Hinblick auf die Verteilung der Lymphgefäße innerhalb des Endometriums. So wurden Gefäße ausschließlich in der Funktionalis (Blackwell et al., 1981), oder nur in der Basalis gefunden (Uchino et al., 1987), oder konnten gar nicht nachgewiesen werden (Koukourakis et al., 2005; Red-Horse et al., 2006). Rogers et al. (2008) konnten schmale und spärlich verteilte Gefäße in der Funktionalis nachweisen, während die der Basalis größer, zahlreicher und öfter mit Spiralarteriolen assoziiert waren. Insgesamt war die Lymphangiogenese in der Basalis vier bis fünf Mal stärker im Vergleich zu der der Funktionalis. Weiterhin wurden Lymphgefäße im Myometrium beobachtet, die verschiedene Größen zeigten (Uchino et al., 1987; Ueki et al., 1991). Der lymphangiogene Wachstumsfaktor VEGF-C wurde vor allem im Drüsenepithel, während der vaskulären Regeneration des Endometriums, sowie in einigen Stromazellen des normal zyklischen Endometriums

detektiert (Rogers et al., 2008). Ein Unterschied von Funktionalis zur Basalis konnte nicht gefunden werden. VEGF-D, ein weiterer lymphangiogener Faktor, wurde sowohl endometrial als auch myometrial nachgewiesen. Im Endometrium zeigte sich dabei keine Differenz zwischen dem glandulären Vorkommen und der Ausprägung im Stroma, ebenso wenig zwischen der Basalis und Funktionalis während des Zyklus (Rogers et al., 2008).

Die Lymphangiogenese in der Endometriose ist bis heute weitgehend unbekannt. Erste Arbeiten haben eine Präsenz von lymphatischen Gefäßen in endometriotischen Läsionen gezeigt (Nisolle et al., 2008). Diese Beobachtung lässt eine aktive lymphogene Stimulation durch endometriotische Zellen vermuten (Nisolle et al., 2008).

1.3 Experimentelle Modelle für die Endometriose

Da die spontane Ausbildung der peritonealen Endometriose von der menstruellen Blutung abhängig ist, kommt diese natürlicherweise nur beim Menschen und bei menstruierenden nicht-humanen Primaten vor (Tabibzadeh et al., 1999). Sehr hohe Kosten sowie ethische Aspekte begrenzen jedoch die Einsatzmöglichkeiten von nicht-humanen Primaten für die Endometriose-Forschung (Story et al., 2004; Fazleabas, 2005). Daher wurden experimentelle in-vitro Modelle sowie Tiermodelle entwickelt, in denen vor allem in Mäusen Endometriose induziert wird. Mit Hilfe dieser ist es möglich, verschiedene Mechanismen, die zur Adhäsion, Invasion, Vaskularisierung und somit zur Persistenz des abgeschiedenen Endometriums an ektopen Lokalisationen führen, genauer zu analysieren. Des weiteren bieten sie die Möglichkeit der pharmazeutischen Testungen.

1.3.1 In-vitro Modell

Zur Aufdeckung der Vorgänge, die zur Adhäsion des endometrialen Gewebes an peritoneale Strukturen führen, wurde das sogenannte CAM-Modell (chicken chorio-

allantoic Membran) entwickelt (Malik et al., 2000; Maas et al., 2001). Nach Kultivierung von humanem endometrialen Gewebe auf der Basalschicht der Chorio-Allantoischen-Membran von fertilen Hühnereiern konnte eine Invasion des Endometriums nach drei Tagen gezeigt werden (Nap et al., 2003 und 2004). Dabei ist eine solide Grundstruktur des Gewebes, bestehend aus Epithelium und Stroma, Voraussetzung (Nap et al., 2003). Ebenfalls konnten Mechanismen der Gefäßeinsprossung, ausgehend von der CAM, in diesem Modell nachgewiesen werden (Maas et al., 2001). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Angiogenese, indiziert durch peritoneale Flüssigkeit von Endometriose-Patientinnen gegenüber selbiger von Nicht-Erkrankten (Oosterlynck et al., 1993), sowie eine Inhibition der Angiogenese durch antiangiogene Faktoren (Nap et al., 2004). Dieses Modell bietet einfachen Zugriff und Überwachung der endometrialen Herde und der Mechanismen während der frühen Adhäsion und Invasion der endometriotischen Läsionen. Um die Entwicklung der Erkrankung über einen längeren Zeitraum, und dabei vor allem immunologische und molekularbiologische Parameter zu analysieren, ist jedoch die Anwendung von in-vivo Modellen, insbesondere immundefizienten Mausmodellen notwendig.

1.3.2 Autologe Tiermodelle

Zur Induktion einer Endometriose durch Transplantation von endometrialem Gewebe in ektopische Lokalisationen haben sich vor allem Ratten und Mäuse bewährt. Auf Grund geringer Haltungskosten, einfacher Handhabung und einer guten Verfügbarkeit sind diese in der Endometrioseforschung weit verbreitet. Dabei sind zwei verschiedene Modelltypen etabliert. Das homologe Nager-Modell ist charakterisiert durch eine autologe Transplantation von eigenem oder genetisch identischem uterinen Gewebefragmenten in die Peritonealhöhle von Kaninchen (Dunselman et al., 1989), Ratten (Vernon und Wilson, 1985) oder Mäusen (Rossi et al., 2000). Hierbei wird meistens das Endometrium nicht vom Myometrium separiert (Vernon et al., 1985; Lin et al. 2006). Nur wenige Studien verwenden hierzu isoliertes

Endometrium (Somigliana et al., 1999; Hirata et al., 2005). Zur verbesserten Wiederfindung der implantierten Läsionen wurden diese durch Nähte fixiert (Lin et al., 2006) oder Fluoreszenz-markiert (Hirata et al., 2005). Auf Grund der Steroidhormonabhängigkeit der ektopen Herde eignet sich dieses Modell zur Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber Steroidhormonen sowie mit dem Hormonsystem interferierenden Therapeutika (Grümmer, 2006). Des weiteren wurde eine Inhibition der experimentell induzierten Endometriose und eine Größenabnahme der transplantierten Herde nach Behandlung mit antiinflammatorischen Agenzien nachgewiesen (Somigliana et al., 1999; Ingelmo et al., 1999; Efstathiou et al., 2005). Phylogenetische, biochemische und hormonelle Unterschiede zwischen humanem und animale Endometrium schränken jedoch eine Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen stark ein. In dieser Hinsicht geeigneter ist das heterologe Mausmodell, das im Folgenden genauer erläutert wird.

1.3.3 Heterologe Mausmodelle

Dieses Modell ist gekennzeichnet durch eine heterologe Transplantation von humanem Endometrium in immundefiziente Mäuse. Vorrangig dabei ist die Nutzung von athymischen Nacktmäusen (Zamah et al., 1984; Bruner et al., 1997; Grümmer et al., 2001), die einen Mangel an T-Lymphozyten aufweisen (Wortis, 1971). Humanes Endometrium der Proliferations- und Sekretionsphase, sowie Menstruationsgewebe konnte erfolgreich kultiviert werden (Story et al., 2004; Grümmer, 2006) und zeigte eine vergleichbare Morphologie mit endometriotischen Läsionen im Menschen. Die Ausbildung und Persistenz der Herde war unabhängig von der Zyklusphase zum Entnahmezeitpunkt (Nisolle et al., 2000). Grümmer et al. (2001) konnten eine Aufrechterhaltung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie der Steroidempfindlichkeit im ektopen Gewebe belegen. Ebenso wiesen sie ein von der Maus ausgehendes Gefäßeinwachsen ab Tag 4 posttransplantationem nach (Grümmer et al., 2001). Eine Steigerung der Wiederfindungsrate der ektopen Läsionen konnte durch eine intraperitoneale Fixierung der endometrialen Läsionen

mit Nähten erreicht werden (Grümmer et al., 2001). Während nur ein Anteil von circa 30 Prozent von frei in die Bauchhöhle injiziertem Endometrium detektiert werden konnte (Grümmer et al., 2001), ließen sich die fixierten Fragmente zu fast 100 Prozent wiederfinden. Weitere Arbeiten zeigten eine verbesserte Identifikation auch makroskopisch nicht sichtbarer Herde durch die Verwendung von Fluoreszenz-Markierungen (Tabibzadeh et al., 1999; Beliard et al., 2002; Defrère et al., 2006). Da die Nacktmaus neben dem innaten Immunsystem auch über intakte B-Lymphozyten verfügt, wurden zudem immundefizientere Mäuse als Endometriosemodelle eingesetzt, um die Zeitspanne der Erhaltung der Heterotransplantate zu verlängern. Hierbei kamen SCID (severe combined immunodeficient)-Mäuse zum Einsatz (Aoki et al., 1994), die einen Defekt im T- und im B-Lymphozyten-System aufweisen. NOD-SCID-Mäuse weisen zusätzlich eine herabgesetzte Toxizität von natürlichen Killerzellen auf (Lin et al., 2006). Bei Verwendung dieser beiden Mausstämme als Endometriosemausmodell wurden höhere Wiederfindungsraten sowie eine besser erhaltene Morphologie und Steroidhormonrezeptorexpression über eine vierwöchige Zeitperiode beobachtet (Aoki et al., 1994; Grümmer et al., 2001).

Rag-1 und Rag-2 defiziente Mäuse weisen ebenfalls keine funktionellen B- und T-Lymphozyten auf. Dem liegt zugrunde, dass Rag (recombination activating)-Gene für Enzyme kodieren, die essentiell für die Generierung von B- und T-Lymphozyten sind, die die Hauptkomponente der adaptiven Immunabwehr darstellen (Janeway, 2001). Die Rekombination-aktivierenden Gene-1 (Rag-1) und -2 (Rag-2) spielen eine bedeutende Rolle in der Zusammenfügung und Rekombination von Genen der Immunoglobuline und T-Zell-Rezeptor-Moleküle. Sie sind zusammen als Heterodimer in der frühen Phase der Lymphozytenentwicklung aktiv und sind Teil der V(variable)-D(diversity)-J(Joining)-Rekombinase, welche für die Antigenrezeptorenvielfalt der Antikörper verantwortlich ist (Mombaerts et al., 1992). Auf Grund ihrer Schlüsselrolle in der Entwicklung der humoralen Abwehr hat eine selektive Ausschaltung des Rag-1 oder Rag-2-Gens somit eine schwere Immundefizienz zur Folge. Rag-1 sowie Rag-2 defiziente Mäuse besitzen keine ausgereiften B- und T-Lymphozyten, haben aber Natürliche Killerzellen.

Einen zusätzlichen Mangel an Natürlichen Killerzellen weisen Rag-2/γ(c) KO-Mäuse auf. Dieser basiert auf der Abwesenheit funktionierender Rezeptoren für Interleukin-2 und -7 sowie weiteren Zytokinen, welche für die Expansion von Lymphozyten sowie Natürlichen Killerzellen verantwortlich sind. Greenberg et al. (2004) kultivierten humanes Endometrium nach subkutaner Transplantation in Mäuse über einen Zeitraum von vier Wochen. Sie induzierten in ihren Versuchen hormonell den humanen weiblichen Zyklus und zeigten, dass nach Progesteronentzug eine Blutung der endometriotischen Herde ausgelöst werden konnte.

Reine Rag-1 oder Rag-2 defiziente Mäuse wurden bisher nicht als Endometriosemodelle eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde humanes Endometrium in Rag-1 defiziente Mäuse sowie vergleichend in athymische Nacktmäuse transplantiert um zu untersuchen, ob der zusätzliche B-Zell-Defekt in den Rag-1 Mäusen einen Einfluss auf den Erhalt der ektopen Läsionen sowie auf die Häm- und Lymphangiogenese in dem ektopen humanen Endometrium hat.

2 Materialien und Methoden

2.1 Humanes Endometrium

Für die Durchführung der Untersuchungen wurde frisch entnommenes humanes prämenopausales Endometrium von insgesamt 19 Patientinnen aus der Abteilung für allgemeine Gynäkologie des Universitätsklinikums Essen (Leitung Professor Dr. Rainer Kimmig) verwendet, bei denen auf Grund von Myomen oder aus diagnostischen Gründen eine Hysterektomie oder Kürettage durchgeführt wurde. Das Durchschnittsalter der Patientinnen lag bei $38,7 \pm 6,3$ Jahren. Eine Hormonbehandlung wurde mindestens drei Monate vor dem Eingriff nicht durchgeführt. Bei keiner Patientin war eine Endometriose bekannt. Zum Zeitpunkt der Operation waren 15 der Patientinnen in der späten Proliferationsphase und 4 in der frühen Sekretionsphase. Die Bestimmung der Zyklusphase erfolgte dabei nach den histomorphologischen Kriterien von Noyes et al. (1975).

Das entnommene Endometrium wurde unmittelbar in mit Moscona gefüllte Falconröhrchen gegeben. Das Endometrium wurde unter der Sterilbank in Petrischalen, die mit Nährmedium (siehe 2.7.2) gefüllt waren, in Fragmente von ca. 2 mm Kantenlänge geschnitten. Von diesem nativen Material wurde je ein Fragment für die morphologische Beurteilung in 4%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, bzw. in Tissue-Tek OCT (Sakura) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Aufbewahrung des übrigen Gewebes in Nährmedium bei 37°C im Brutschrank für höchstens 3 Stunden.

2.2 Versuchstiere

In den Versuchen wurden insgesamt 36 weibliche Tiere von zwei verschiedenen immundefizienten Mausstämmen verwendet. 21 Nacktmäuse (NMRI nu/nu)

stammten aus der Zucht des Zentralen Tierlabors der Universitätsklinik Essen (Leitung: PD Dr. Gero Hilken). 15 Rag-1^{-/-}-Mäuse wurden durch Verpaarung generiert, s.2.2.1. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Barriere-Bedingungen bei einem regulierten 12-stündigen Tages- und Nachtrhythmus. Die Experimente wurden nach § 15 des Tierschutzgesetzes genehmigt (Aktenzeichen 50.05-230-83/04). Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen zwei und drei Monate alt.

2.2.1 Züchtung und Genotypisierung von Rag-1^{-/-}-Mäusen

Zur Züchtung von Rag-1^{-/-}-Mäusen standen männliche und weibliche heterozygote Mäuse sowie Wildtyp-Mäuse zur Verfügung. Bei Erreichen der Geschlechtsreife wurden heterozygote Rag-1^{-/-}-Mäuse untereinander oder mit Wildtyp-Mäusen verpaart. Den Jungtieren wurde im Alter von ungefähr 10 Tagen eine Ohrspitze oder die Schwanzspitze kopiert und im Folgenden für die DNA-Analyse per Polymerase-Ketten-Reaktion verwendet.

2.2.1.1 DNA Isolation

Für die Isolation der DNA wurde das zuvor kopierte Gewebe der Maus in einem Schraub-Eppendorf-Gefäß mit 500 µl Lysispuffer (s. 2.7.2) sowie 8 µl Proteinase K (Qiagen) behandelt und in diesen Substanzen bei 55°C über Nacht im Rollinkubator inkubiert. Nach circa 24 Stunden wurde 1000 µl Isopropanol hinzugegeben und das Eppendorf-Gefäß kräftig geschüttelt. Dabei fiel die DNA als Faden aus. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 750 µl 70 %igem Ethanol und anschließendem Vortexen erfolgte eine erneute 10-minütige Zentrifugation bei 4°C, der Überstand wurde wiederum verworfen und die DNA durch Zentrifugation im Speed vac (Savant) bei geöffnetem Eppendorf-Gefäß getrocknet. Abschließend erfolgte eine Zugabe von 50 µl Aqua dest. und eine weitere Inkubation bei 60°C im Wärmeschrank für eine Stunde.

Danach wurden die Proben entweder sofort für die Polymerase-Ketten-Reaktion verwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur finalen Bestimmung des Genotypes der Rag-1-defizienten Mäuse war die Durchführung einer Polymerase-Ketten-Reaktion erforderlich. Die Schritte der PCR beinhalten die Denaturierung bei 94°C zur Auftrennung beider DNA-Stränge, das Annealing bei 55°C zur Hybridisierung der Oligonucleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA, sowie die Elongation bei 72°C zur Synthese des komplementären DNA-Stranges durch die hitzestabile Taq-Polymerase. Für jede PCR wurde folgender Ansatz mit einem Volumen von insgesamt $50\text{ }\mu\text{l}$ eingesetzt:

steriles H ₂ O	30,5 μl
10x Puffer	5 μl
dNTP (10mM)	1 μl
mRag 1.2 (10pmol/ μl)	5 μl
mRag 1.4 (10pmol/ μl)	1 μl
mPGKpA1 (10pmol/ μl)	5 μl
Taq Polymerase	0,5 μl
DNA-Probe	2 μl

Folgenden Oligonukleotid-Sequenzen wurden als Primer verwendet:

- mRAG1.2 : ATCTGTGGGAATCGTTTCAAGAG
- mRAG1.4 : TGGGCAGTAAAACAGATGTC
- mPGKpA1 : TGTTAAGAAGGGTGAGAACAGAG

Der PCR-Zyklus wurde 30mal wiederholt, bevor eine konstante Kühlung der vervielfältigten DNA-Proben bei 4°C bis zu deren weiteren Verarbeitung erfolgte.

2.2.1.3 Gel-Elektrophorese

Die durch die PCR amplifizierte DNA wurde mittels Gel-Elektrophorese analysiert. Nach Zusatz eines DNA-Probenpuffers (Zusammensetzung, siehe 2.7.2) wurden die Proben auf ein zuvor vorbereitetes 2%iges, mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel aufgetragen. Um die Anzahl der Basenpaare der jeweiligen Probe bestimmen zu können, wurde ein Basenpuffer mit einer Anzahl von 1000 Basenpaaren (1000 BP DNA-Leiter Genecraft, Lüdinghausen) zum Vergleich parallel aufgetragen. Die Gel-Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 125 Volt für circa 40 Minuten durchgeführt, so dass die DNA-Proben entsprechend ihrer Größe im Gel wandern konnten. Daraufhin erfolgte die Auswertung unter UV-Licht. In der Abbildung 1 ist beispielhaft ein Foto eines Gels zu sehen, welches die verschiedenen Banden der analysierten DNA-Proben unterschiedlicher RAG-1-Genotypen zeigt:

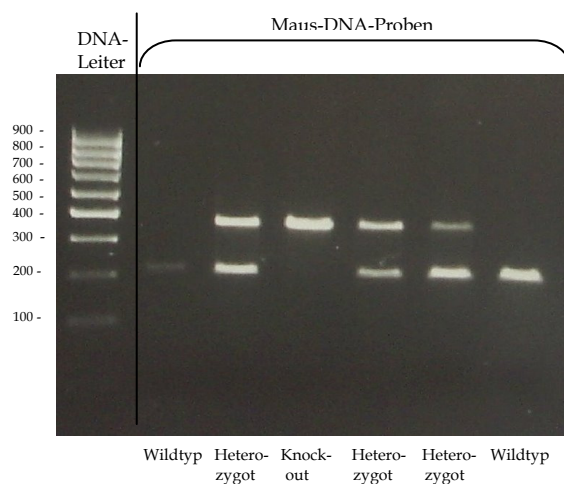


Abbildung 3:

Agarosegel mit DNA-Proben nach erfolgter Elektrophorese. In der linken Tasche wurde die DNA-Leiter mit einer Größe von insgesamt 1000 Basenpaaren (bp) zum Größenvergleich aufgetragen. Die am weitesten gelaufene Bande entspricht dabei einer Größe von 100 bp. Die Abstände der einzelnen Banden betragen jeweils 100 bp. In den anderen Kammern sind jeweils die analysierten DNA-Proben zu sehen. Dabei entspricht eine doppelte Bande einem heterozygotem Genotyp, eine Bande bei circa 400 Basenpaaren weist auf einen für das Rag-1-Knockout-Gen homozygoten Genotyp hin und eine Bande bei circa 200 Basenpaaren charakterisiert einen Wildtyp.

Weibliche Rag-1-KO-Mäuse wurden nach Erreichen der Geschlechtsreife ab einem Alter von acht Wochen für die Transplantation des humanen Endometriums verwendet. Heterozygote weibliche und homozygote männliche Rag-1-KO-Mäuse wurden zur weiteren Züchtung verwendet.

2.3 Transplantation des humanem Endometrium-Gewebes

Für die Transplantation des humanen Endometriumgewebes wurden die Tiere mit Xylazin und Ketamin im Verhältnis 1:4 (beides; Essex Pharma, München), in Narkose versetzt. Nach Einsetzen der Narkose wurden die Rag-1^{-/-}-Mäuse an Bauch und Rücken rasiert.

Mit Hilfe einer kleinen Schere wurde nun die Rückenhaut durch einen circa 1 cm langen Schnitt eröffnet. Daraufhin wurde, jeweils rechts und links, ein mit Nahtgarn (Vicryl, Norderstedt) der Stärke 6-0 fixiertes Endometrium-Fragment subkutan innen an die Haut eingenäht. Nach Verschluss der Wunde mit 5-0 Garn (Vicryl, Norderstedt) und Einzelknopfstichen erfolgte nun die Laparotomie, wobei das Abdomen durch einen circa 1 cm langen Schnitt eröffnet wurde. Zunächst wurde die Haut stumpf von der Bauchmuskulatur gelöst. Dann wurde die Bauchmuskulatur aufgetrennt und so die Bauchhöhle eröffnet. Nun wurden beidseits jeweils zwei im Nahtgarn (6-0, Vicryl, Norderstedt) fixierte Endometriums-Fragmente an das parietale Peritoneum angenäht. Der Verschluss der Bauchmuskulatur erfolgte durch Einzelknopfnähte mit 6-0 Nahtgarn (Vicryl, Norderstedt). Die Bauchhaut wurde entsprechend der Rückenhaut mit 5-0 Nahtgarn (Vicryl, Norderstedt) verschlossen.

Es erfolgte eine tägliche Wundkontrolle während der ersten vier Tage.

2.4 Entnahme der Endometriumsherde

Nach vier, acht oder zwölf Wochen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die innere Rückenhaut sowie das parietale Peritoneum wurden resektioniert und gründlich inspiziert.

Die makroskopisch wiedergefundenen Läsionen, sowie auch die Bereiche des Peritoneums, an denen zuvor kein Fragment gefunden werden konnte, die aber durch Nahtreste als Transplantationsstellen identifiziert werden konnten, wurden sorgfältig aus der Maus herausgetrennt und in 10 % Formalin für 12 Stunden fixiert und mit Hilfe des Einbettautomaten (Shandon) in Paraffin eingebettet oder in Tissue Tek O.C.T. (Sakura) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20° Celsius gelagert.

2.5 Histologie

Zur histomorphologischen Beurteilung wurde von den in Paraffin eingebetteten Geweben mit einem Mikrotom (Jung AG) 8 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden, nach einer Trocknungszeit von mindestens 24 Stunden bei 50 ° Celsius, mit einer Hämatoxilin-Eosin-Färbung gefärbt (s. 2.7.2) um mikroskopisch die endometriale Herkunft der eingebetteten Fragmente zu bestätigen. Kryostatschnitte wurden mit einem Gefriermikrotom (Leitz) in einer Dicke von 8 µm angefertigt und mit Toulidinblau gefärbt.

2.5.1 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten zum Teil an Gefrier- und zum Teil an Paraffinschnitten. Gefrierschnitte wurden hierzu auf runde Deckgläschen aufgezogen, in 12-Wellplatten (Becton Dickinson) gegeben und nach einer kurzen Antrocknungsphase von 5 Minuten in bei -20 ° Celsius gekühltem 96 % Alkohol fixiert. Es folgte ein 5 minütiger Waschgang mit PBS (s. 2.7.1), eine 10-minütige

Inkubation mit H_2O_2 zur Blockade der endogenen Peroxidase-Aktivität und wiederum ein 5-minütiger Waschgang mit PBS. Die Schnitte wurden dann für mindestens 30 Minuten in PBS mit BSA (0,5%) (Bovine Serum Albumin) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen bei Raumtemperatur inkubiert. Paraffinschnitte wurden in Histoclear (2 x 5 Minuten), dann in einer absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol, 1 Minute; 96% Ethanol, 70% Ethanol, Aqua dest., jeweils 3 Minuten) entparaffiniert, mit PBS gewaschen (5 Minuten) und für ca. 5 Minuten mit einem Citrat-Puffer behandelt. Daraufhin wurden sie erneut mit PBS gewaschen (5 Minuten). Die Präparate wurden dann auf dem Objektträger mit einem Markierstift (Dako Pen, Kat. No. S2002) umkreist, um so den Antikörper möglichst gezielt auf den Gewebeschnitt auftragen zu können.

Die weiteren Schritte der Immunhistochemie wurden für Gefrier- und Paraffinschnitte gleich durchgeführt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Verdünnung s. Tabelle 1) erfolgte für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurden die Präparate 3 x 5 Minuten mit PBS gespült, bevor im nächsten Schritt der Sekundärantikörper (s. Tabelle 1) für 30 Minuten und wiederum bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben wurde.

Nach erneuter 3 x 5 minütiger Spülung mit PBS wurden die Präparate für 30 Minuten mit StreptAB-Complex/HRP als Detektionssystem (s. Tabelle 1) inkubiert. Es folgte noch mal eine 15-minütige Spülung, bevor die Inkubation mit dem Chromogen (DAB) für 5 - 10 Minuten durchgeführt wurde. Unmittelbar darauf wurden die Präparate mit Aqua dest. gespült. Im Anschluss wurde bei einem Teil der Serienschnitte eine Gegenfärbung mit Toulidinblau für Kryo-Schnitte, bzw. Hämatoxilin für Paraffin-Schnitte durchgeführt. Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol → 96% Ethanol → Isopropanol) für jeweils 3 Minuten, und nach einer Waschung in Histoclear erfolgte das Eindecken mit Histomount. Die Auswertung und das Fotografieren der Schnitte erfolgten mit Hilfe eines Axiophots der Firma Zeiss mit digitaler Kameraausrüstung.

Tabelle 1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie

Primär-antikörper	Verdün-nung	Sekundär-antikörper	Verdün-nung	Detektionssystem	Verwendung
rat anti-mouse panendothelial Antigen (PAN) Pharmingen 09921D	1:100	rabbit anti- rat, biotinyliert Dako E 0468	1:400	StreptABComplex/ HRP (biotinylated horse radish peroxidase) Dako Z 0113	Gefrier- schnitte in Verbindung mit einer DAB Färbung
rat anti-mouse PECAM-1 (CD 31), MEC 13.3 ¹ , Pharmingen 01951A	1:200	rabbit anti- rat, biotinyliert Dako E 0468	1:400	StreptABComplex/ HRP (biotinylated horse radish peroxidase) Dako Z 0113	Gefrier- schnitte in Verbindung mit einer DAB Färbung
rabbit anti- mouse Actin, Smooth Muscle Thermo Fisher Scientific RB9010PCS	Keine Verdün- nung	goat/horse anti-rabbit, biotinyliert Dako E 0432	1:200	StreptABComplex/ HRP (biotinylated horse radish peroxidase) Dako Z 0113	Paraffin- schnitte in Verbindung mit einer DAB- Färbung
rabbit anti-mouse Lyve-1 ReliaTech 103-PA50AG	1:150 oder 1:200	goat/horse anti-rabbit, biotinyliert Dako E 0432	1:200	StreptABComplex/ HRP (biotinylated horse radish peroxidase) Dako Z 0113	Gefrier- schnitte und Paraffin- schnitte in Verbindung mit einer DAB- Färbung

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-Test mit Hilfe des Programmes SPSS. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

2.7 Chemikalien und Lösungen

2.7.1 Chemikalien

- 2,2,2- Tribromethanol, Aldrich, T 4.840-2
- 2-Methyl-2-Butanol (t-Amylalkohol), Sigma, A1685
- Agarose, PeqLab (Erlangen),
- Antibody diluent with background reducing components, DAKO, S 3022
- BSA (bovine serum albumine), Sigma, A 8022
- β -Mercaptoethanol, Merck KG aA (Darmstadt), 444203
- DAB+ liquid chromogen solution (Diaminobenzidin), DAKO, K 3467
- DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium), Gibco (Karlsruhe), 41966-029
- 1000 bp DNA Leiter, Genecraft (Lüdinghausen),
- DNase I, Invitrogen (Karlsruhe)
- dNTP-Mix, Genecraft (Lüdinghausen)
- Eosin, Merck KG aA (Darmstadt), 2357423
- Ethidiumbromid, Serva (Heidelberg)
- Formaldehyd 35 %, Merck KG aA (Darmstadt), 1.04001.2500
- HAMs F12, Biochrom KG (Berlin), F0815
- Histoclear (Xylolersatz), Shandon (Frankfurt), 9909309-W
- Histomount (Xylolersatz-Eindeckmedium), Shandon (Frankfurt), 9999122
- Instant Hämatoxylin, Shandon (Frankfurt), 6765015
- isotone NaCl-Lösung (0,9%) Braun (Melsungen)
- Ketamin, Essex Pharma (München)
- Lysispuffer, Sigma-Kit, Sigma-Aldrich (USA), T3073
- PBS (Phosphate Buffered Saline) Dulbecco Instamed 9,55 g/l w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , Biochrom KG (Berlin), L 182-50
- M-MLV Reverse Transcriptase + Puffer, Invitrogen (Karlsruhe)
- Penicillin (50000 IU/ml), Boehringer, 1074440
- Proteinase K, Qiagen (Hilden)

- Streptomycin (50 mg/ml), Boehringer, 10744440
- Suprapur-Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 %,Merck (Darmstadt), KG aA,1.07209.0250
- Taq Polymerase + Puffer, Genecraft (Lüdinghausen)
- Tissue Tek, Sakura O.C.T.TM Compound (Zoeterwoude, NL), (4583) 99 221
- Toluidinblau, Sigma, T3260
- Xylazin, Essex Pharma (München)

2.7.2 Zusammensetzung der Lösungen

Agarose-Gel:

8 Gramm Agarose PeqLab (Erlangen) auf 400 ml 1xTBE (s.u.), 4 Minuten in der Mikrowelle auflösen, dann in 60°C-Schrank aufbewahren; Nach Abkühlung auf 60°C, Zugabe von 20 µl Ethidiumbromid

Citrat Puffer:

Lösung A: 0,1 M Zitronensäure in 1 l Aqua dest.

Lösung B: 0,1 M Natriumcitrat in 1 l Aqua dest., 9 ml Lösung A und 41 ml Lösung B zu 450 ml Aqua dest.

DNA-Probenpuffer:

25 mM Tris/HCl (pH 7,0), 150 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 25% Glycerin

Ethidiumbromidlösung:

10 mg/ml in Aqua dest.

Hämatoxilin-Eosin-Färbung:

5 Minuten	Histoclear I (Shandon)
5 Minuten	Histoclear II (Shandon)
3 Minuten	Isopropanol (100%)
3 Minuten	Ethanol (96%)
3 Minuten	Ethanol (70%)
3 Minuten	Aqua dest.
5 Minuten	Hämatoxilin
kurz	Waschen mit H ₂ O
kurz	HCl
5-8 Minuten	Waschen in H ₂ O
5 Minuten	Eosin
kurz	Ethanol I (96%)
kurz	Ethanol II (96%)
kurz	Ethanol III (96%)
kurz	Isopropanol (100%)
1 Minute	Isopropanol (100%)
5 Minuten	Histoclear III (Shandon)
5 Minuten	Histoclear IV (Shandon)

Moscona-Lösung:

140 mM NaCl, 4 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0,2 mM KH₂PO₄, 0,4 mM NaH₂PO₄·xH₂O,
0,9 mM D-Glucose Monohydrat

Nährmedium:

500 ml Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium, 500 ml Ham's F12, 100 U/ml
Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Rhompun-Ketamin-Mischung:

5 ml NaCl 0,9%

1 ml Ketamin 10% (Essex Pharma, München)

0,25 ml Xylazin 2% (Essex Pharma, München)

TBE-Puffer (10x):

890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA

3 Ergebnisse

3.1 Wiederfindungsraten von subkutan und intraperitoneal implantiertem Endometrium

Das humane Endometriumgewebe wurde in Rag-1^{-/-} sowie in Nacktmäuse implantiert und bis zu zwölf Wochen kultiviert. Nach den untersuchten Zeitperioden von vier, acht und zwölf Wochen wurde für die Entnahme der subkutan implantierten Fragmente die Rückenhaut eröffnet, die intraperitonealen endometrialen Läsionen wurden nach Eröffnung des Abdomens entnommen. Die Transplantationsstellen, an denen kein Endometriumfragment sichtbar war, konnten durch noch vorhandenes Nahtmaterial identifiziert werden. An diesen Stellen wurde das umgebende Gewebe ektomiert und histologisch aufgearbeitet, um ein eventuelles Einwachsen des endometrialen Gewebes in das Wirtsgewebe zu überprüfen. Nach vier, acht und zwölf Wochen konnte in beiden Mausstämmen sowohl subkutan als auch intraperitoneal transplantiertes Endometriumgewebe makroskopisch wiedergefunden werden (Abb. 4A, B).

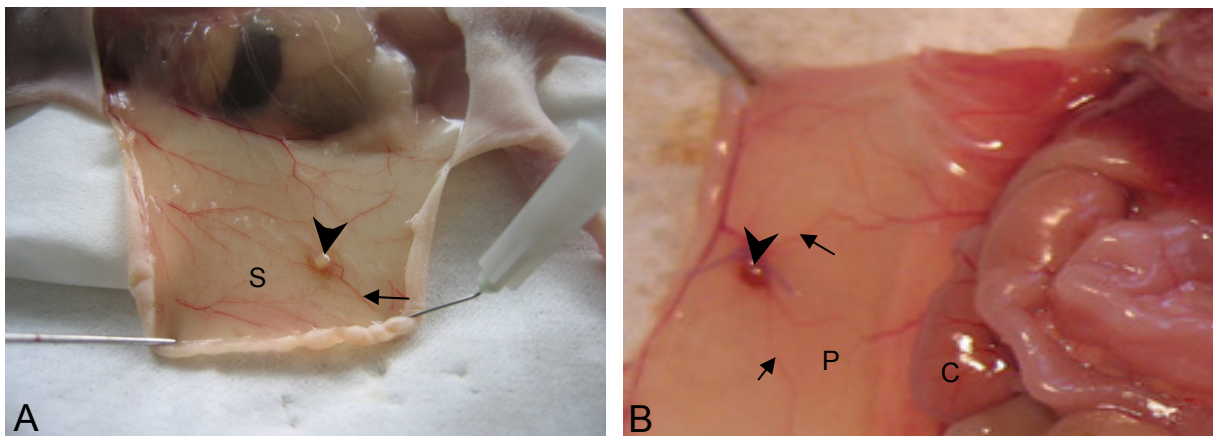


Abbildung 4:

Makroskopisches Erscheinungsbild von in die Nacktmaus transplantiertem humanem endometrialen Gewebe.

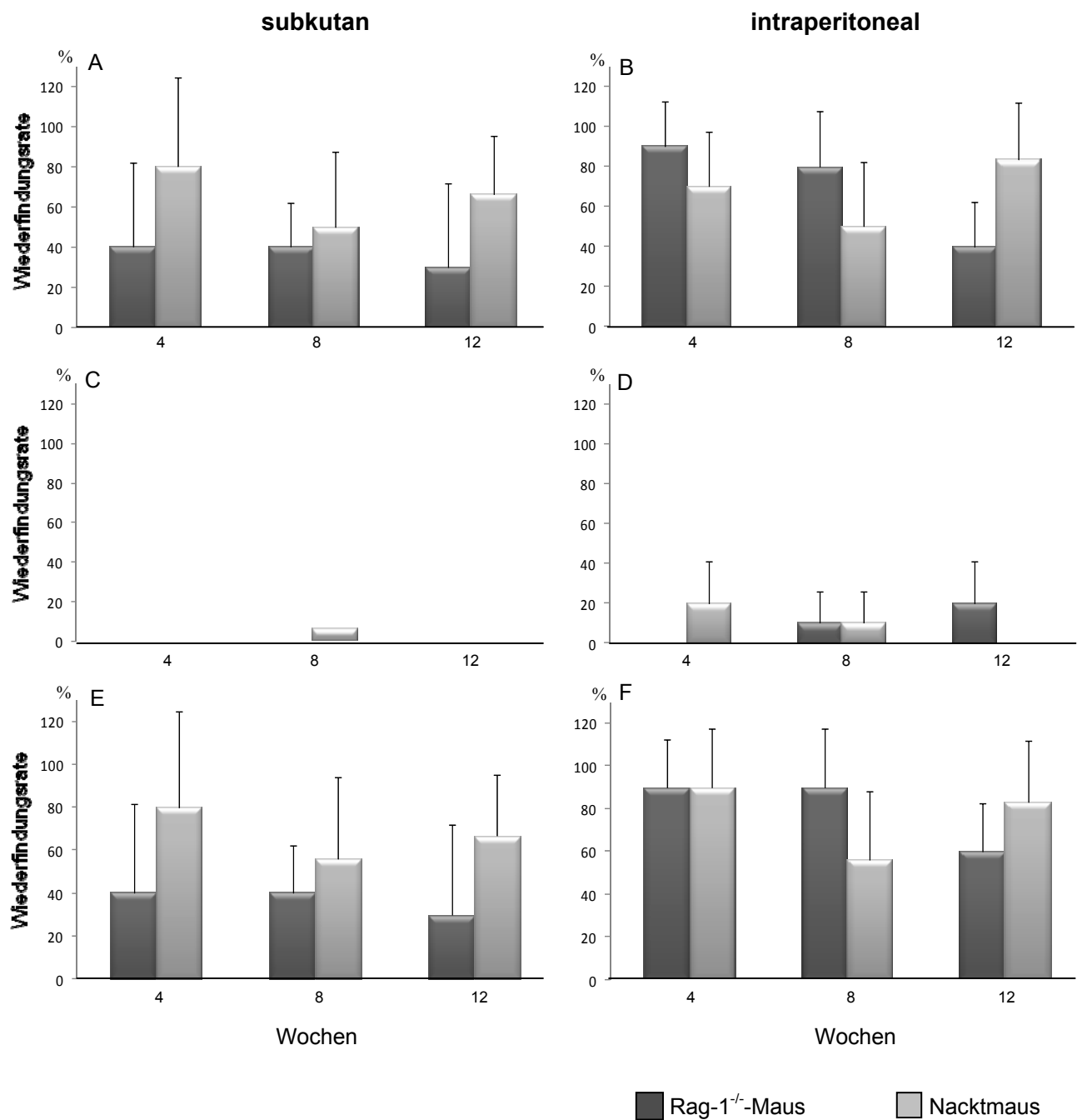
A) Subkutan implantiertes Endometriumsfragment nach zwölfwöchiger Kultur.

B) Intraperitoneal implantiertes Fragment nach vierwöchiger Kultur.

Die Pfeilspitze markiert das humane Gewebe, die Pfeile murine Gefäße.

S = Subcutis, P = Peritoneum, C = Colon.

Die endometrialen Läsionen ließen sich gut vom Mausgewebe abgrenzen und wiesen in ihrer Umgebung eine verstärkte Angiogenese auf. Die quantitative Auswertung zeigte, dass die Wiederfindungsrate der subkutan implantierten Läsionen in der Rag-1^{-/-}-Maus mit durchschnittlich 30 bis 40 % geringer war als die der subkutan in der Nacktmaus implantierten Fragmente mit etwa 50 bis 80 % (Abb. 5A). Dieser Unterschied konnte interessanterweise nicht nach intraperitonealer Implantation beobachtet werden (Abb. 5B). Während in Rag-1^{-/-}-Mäusen nach intraperitonealer Kultur vor allem im Zeitraum bis zu acht Wochen mit einer durchschnittlichen Wiederfindungsrate von 80 bis 90 % deutlich mehr Läsionen wiedergefunden werden konnten als nach subkutaner Implantation, zeigte sich dieser Unterschied bei in Nacktmäusen kultiviertem Gewebe nicht (Abb. 5A, B). Ein Teil der makroskopisch nicht sichtbaren implantierten Läsionen war in das umgebende Gewebe eingewachsen und konnte nur histologisch identifiziert werden. Interessanterweise trat dieses Phänomen fast nur nach intraperitonealer Transplantation auf (Abb. 5C, D). Hier lag der Anteil der nur histologisch zu identifizierenden Läsionen in beiden Mausstämmen zwischen 10 und 20 % (Abb. 5D). Im Gegensatz dazu trat ein Einwachsen des humanen Gewebes in das umgebende Wirtsgewebe nach subkutaner Transplantation nur in einem Fall nach achtwöchiger Kultur in der Nacktmaus auf (Abb. 5C). Die Abbildungen 5E und F zeigen die Summe der makroskopisch und rein histologisch identifizierten endometrialen Läsionen.

**Abbildung 5A - F:**

Wiederfindungsraten der subkutan (A, C, E) und intraperitoneal (B, D, F) implantierten endometrialen Läsionen nach vier, acht und zwölf Wochen der Kultur;

A, B: Makroskopisch wiedergefundene endometriale Läsionen.

C, D: Wiederfindungsraten der rein histologisch detektierten endometrialen Läsionen.

E, F: Summe der sowohl makroskopisch als auch rein histologisch detektierten endometrialen Läsionen.

3.2 Größe der ektopen Endometriumsherde

Bei der Resektion der implantierten humanen Gewebefragmente wurde noch in situ die Größe der makroskopisch wiedergefundenen endometrialen Herde bestimmt. Peritoneale Läsionen, die nur histologisch, aber nicht makroskopisch identifiziert werden konnten (s. Kapitel 3.1), wurden bei dieser Auswertung mit 0 % der Ausgangsgröße klassifiziert.

In beiden Mausstämmen zeigte sich sowohl nach subkutaner als auch nach intraperitonealer Implantation eine Größenabnahme im Vergleich zum Ausgangsgewebe. Die Größe der endometrialen Fragmente reduzierte sich im Verlauf der Kulturdauer auf etwa 50 bis 30 % der Ausgangsgröße, wobei die in der Nacktmaus kultivierten Läsionen sowohl subkutan als auch nach intraperitonealer Transplantation tendenziell etwas größer waren, als die in der Rag-1^{-/-}-Maus kultivierten Fragmente (Abb. 6A, B).

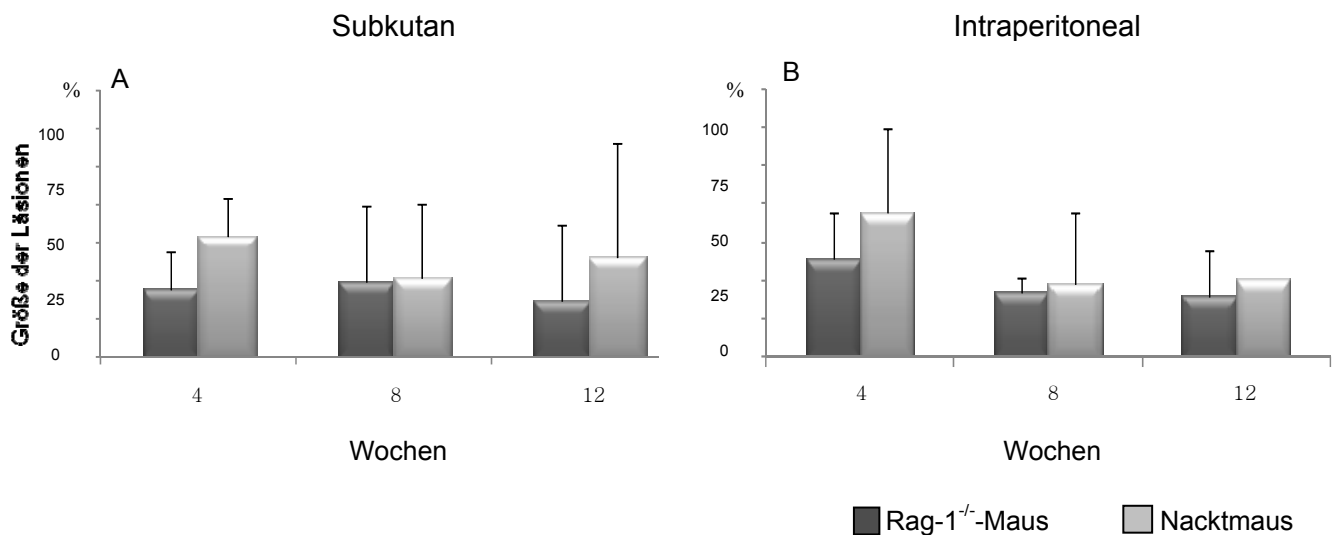


Abbildung 6:

Größe der subkutan (A) und intraperitoneal (B) transplantierten endometrialen Läsionen nach vier, acht und zwölf Wochen der Kultur.

100 % = Größe des Fragmentes zum Zeitpunkt der Implantation.

3.3 Morphologie des humanen endometrialen Gewebes nach Kultur in Rag-1^{-/-} und Nacktmaus

Die Histomorphologie des transplantierten Endometriums wurde nach subkutaner bzw. intraperitonealer Transplantation in beide Mausstämme nach Kultivierungszeiträumen von vier, acht und zwölf Wochen untersucht. Mit Hilfe einer Hämatotoxylin-Eosin- bzw. Toulidinblau-Färbung ließ sich mikroskopisch eine Endometrium-typische Morphologie mit gut erhaltenem Drüsenepithel und Stroma über den gesamten Kultivierungszeitraum von bis zu zwölf Wochen erkennen (Abb. 8). Im Vergleich zu dem frisch entnommenem endometrialen Ausgangsgewebe (Abb. 7) zeigten sich zu allen Zeitpunkten unabhängig von der Lokalisation der Fragmente deutlich vergrößerte Drüsenlumina, was auf eine persistierende Sekretion des Drüsenepithels hinweist. Zudem ließ sich eine Adhäsion an und eine Invasion in das Wirtsgewebe feststellen. Dies zeigte sich vor allem bei den intraperitonealen Läsionen durch eine Penetration des humanen Endometriums in das murine Muskelgewebe (Abb. 9).

In Bezug auf den morphologischen Erhalt der Fragmente konnte weder ein Einfluss der Lokalisation, subkutan oder intraperitoneal, noch des verwendeten Mausstammes beobachtet werden.

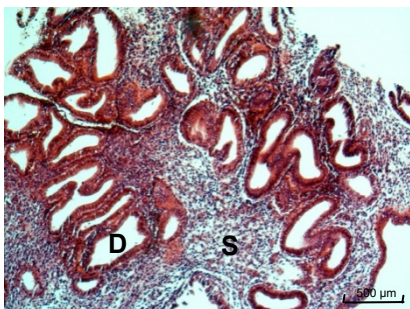
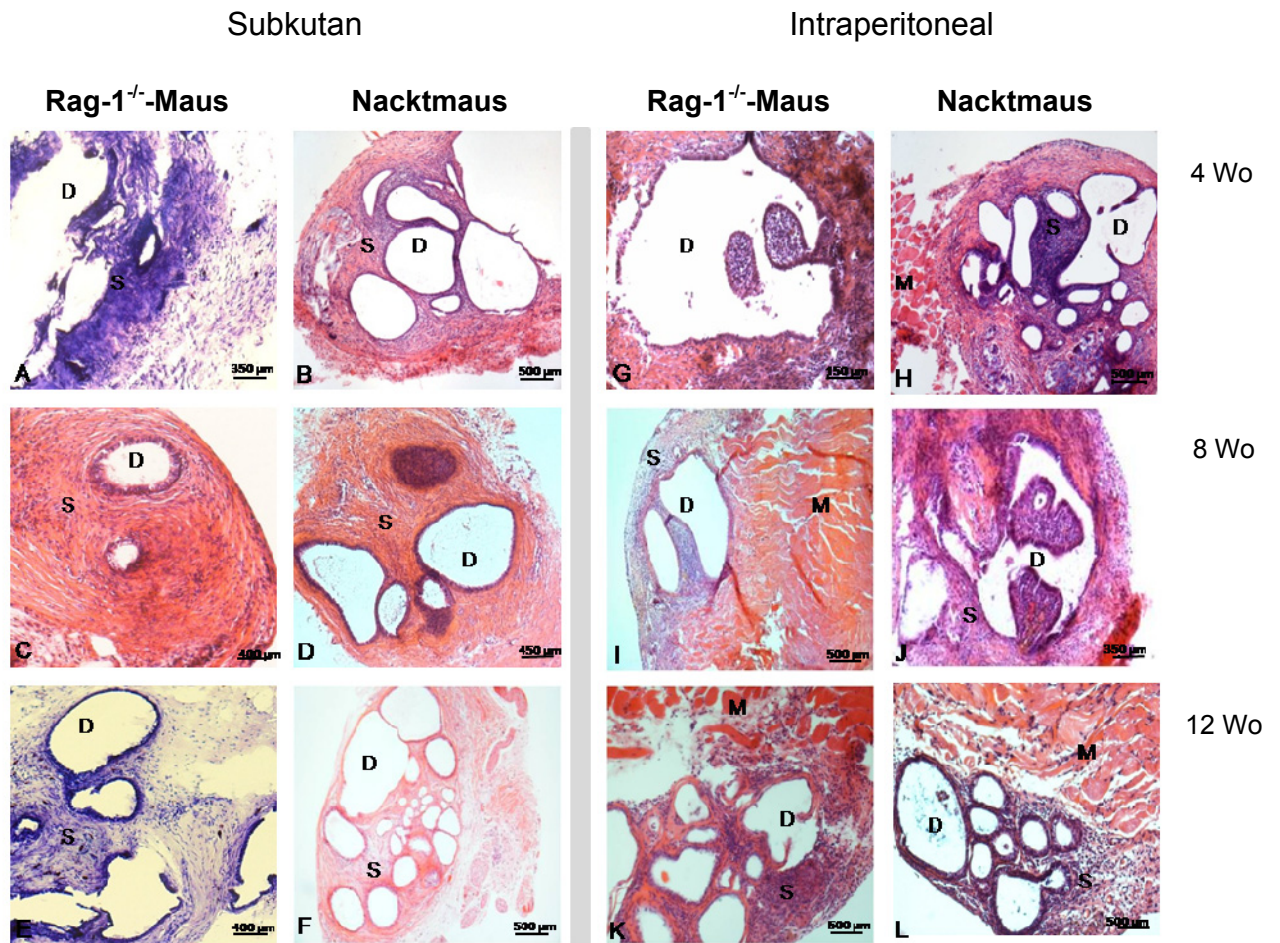


Abbildung 7:

Frisch entnommenes endometriales Gewebe aus der späten Proliferationsphase des Menstruationszyklus vor der Transplantation (Hämatotoxylin-Eosin-Färbung).

S = Endometriales Stroma, D = Endometriale Drüsen.

**Abbildung 8:**

Histomorphologie der subkutan (A - F) und intraperitoneal (G - L) implantierten und über vier (A, B, G, H), acht (C, D, I, J) und zwölf (E, F, K, L) Wochen kultivierten endometrialen Läsionen in Rag-1^{-/-}- und Nacktmaus (A, E: Toulidinblau-Färbung; B - D und F - L: Hämatoxylin-Eosin-Färbung).
S = Endometriales Stroma, D = Endometriale Drüsen, M = Murines Muskelgewebe.

**Abbildung 9:**

Intraperitoneal implantiertes endometriales Fragment nach achtwöchiger Kultur in der Rag-1^{-/-}-Maus (HE-Färbung). Zu erkennen ist die Adhäsion und Invasion des humanen Transplantats zwischen die murinen Muskelfasern (Pfeil).
S = Endometriales Stroma,
D = Endometriale Drüse, M = Murines Muskelgewebe.

3.4 Angiogenese in den humanen ektopen endometrialen Läsionen

3.4.1 Hämangiogenese

Zur Analyse der verschiedenen Entwicklungsstufen bei der Angiogenese wurden die Gefäßendothelien der in das humane Gewebe eingesprossenen Mausgefäße mittels eines gegen den Maus-spezifischen Endothelienoberflächenmarker CD31 gerichteten Antikörpers markiert. Perizyten, die diese neugebildeten Gefäße in einer späteren Entwicklungsstufe stabilisieren, wurden mit alpha-smooth-muscle-actin(α -SMA)-Antikörpern sichtbar gemacht.

CD31-positive Endothelzellen ließen sich in den humanen endometrialen Läsionen sowohl nach subkutaner als auch nach intraperitonealer Implantation und über den gesamten Kultivierungszeitraum von zwölf Wochen in beiden untersuchten Mausstämmen beobachten (Abb. 10). Die Lokalisation α -SMA-positiver Gefäße zeigt beispielhaft die Abbildung 11. Auch von Perizyten stabilisierte murine Gefäße ließen sich sowohl nach subkutaner (Abb. 11A) als auch nach intraperitonealer Kultur (Abb. 11B) identifizieren.

Sowohl CD31- als auch α -SMA-positive Gefäße konnten dabei sowohl an der Adhäsionszone zwischen humanem und murinem Gewebe als auch zentral interglandulär in den implantierten Fragmenten lokalisiert werden.

Abbildung 10:

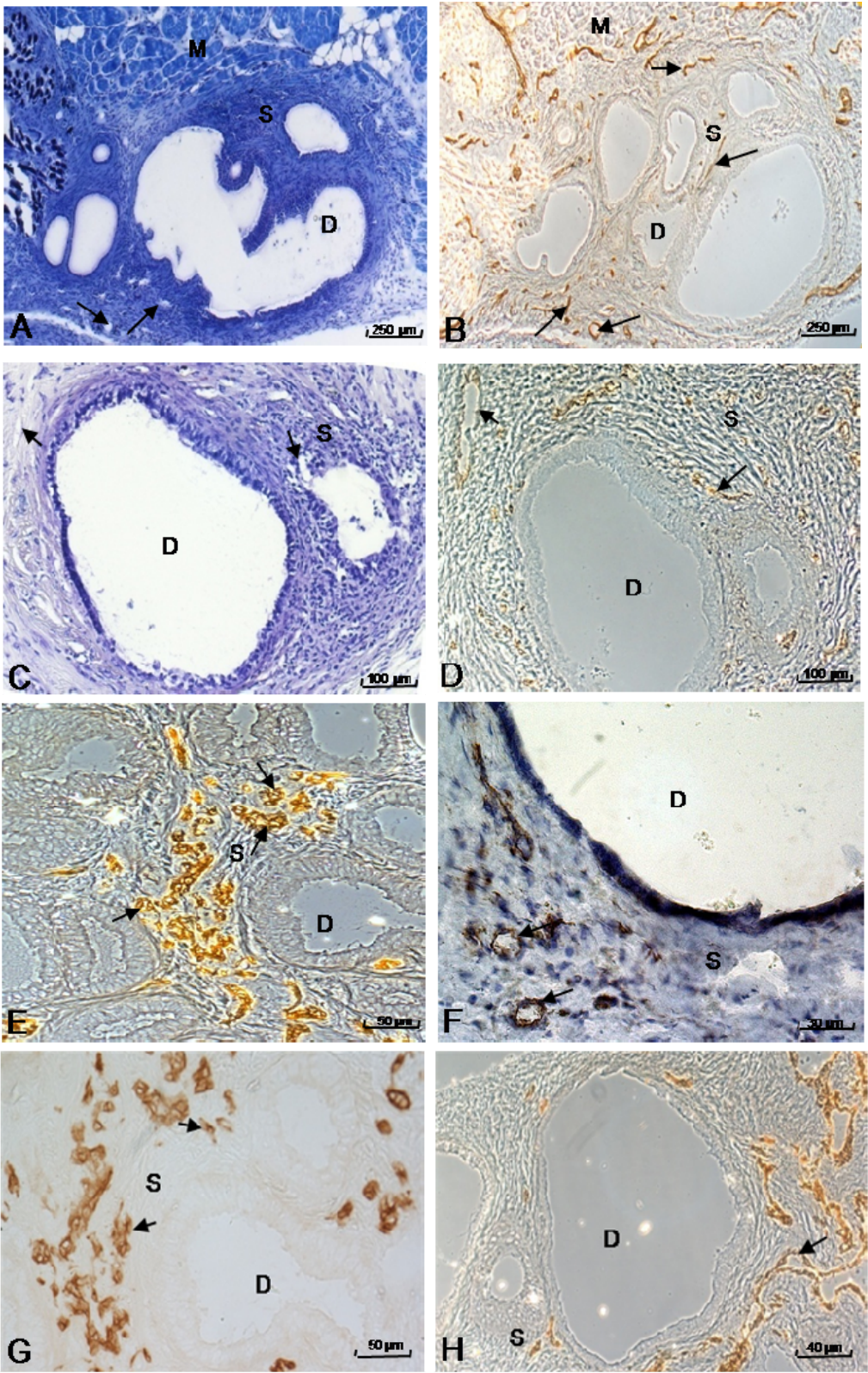
Färbung der Mausendothelien mit dem anti-Maus-CD31-Antikörper.

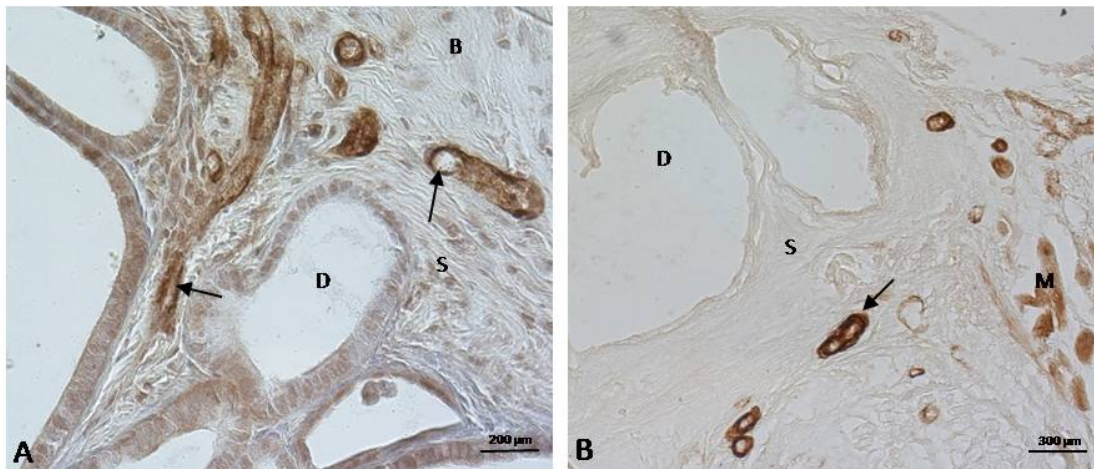
A, B: Endometriumfragment nach vierwöchiger intraperitonealer Kultur in der Rag-1^{-/-} Maus. Einsprossende Gefäße sind sowohl in der Adhäsionszone zwischen Mausgewebe und humanem Gewebe zu erkennen (B, Pfeil), als auch weit in die Läsion eingewachsen (B, Pfeilspitze). A = Toulidinblaugefärbter Parallelschnitt zu B.

C, D: Auch nach subkutaner Implantation wachsen Wirtsgefäße in die humanen Läsionen ein, hier nach achtwöchiger Kultur in der Nacktmaus (D, Pfeil). C = Toulidinblaugefärbter Parallelschnitt zu D.

E,F,G,H: Vergrößerte Darstellung der Endometriumfragmente nach achtwöchiger subkutaner Kultur in der Nacktmaus (F: mit Toulidinblau gegengefärbt). Deutlich zu erkennen sind die interglandulär (E,G,H: Pfeile) und ins endometriale Stroma (F,H: Pfeile) eingewachsenen murinen Gefäße.

S = Endometriales Stroma, D = Endometriale Drüsen, M = Murines Muskelgewebe, Pfeile = Murine Blutgefäße.



**Abbildung 11:**

Subkutane (A) und intraperitoneale (B) Hämangiogenese in humanen Endometriumsfragmenten nach vierwöchiger Kultur in der Nacktmaus mit Darstellung der durch Perizyten stabilisierten Gefäße unter Verwendung des alpha-smooth-muscle-actin-Antikörpers (Pfeile).

S = Endometriales Stroma, D = Endometriale Drüsen, M = Murines Muskelgewebe, B = Murines Bindegewebe, Pfeile = Murine Blutgefäße.

Die quantitative Auswertung der CD31-, bzw. α -SMA-positiven Gefäße erfolgte durch Berechnung der Anzahl der gefärbten Gefäße eines Gewebeschnittes in Bezug zu dessen Fläche.

Im Hinblick auf die Dichte CD31-positiver Gefäße zeigte sich zwar sowohl nach subkutaner als auch nach intraperitonealer Implantation nach vier Wochen tendenziell eine stärkere Angiogenese in Rag-1^{-/-}-Mäusen und nach acht bzw. zwölf Wochen in den in Nacktmäusen kultivierten Läsionen, jedoch war generell kein signifikanter Unterschied in der Gefäßbildung zwischen den beiden Mausstämmen zu beobachten (Abb. 12A, B). In den in der Nacktmaus kultivierten Läsionen zeigte sich ein deutlicher Anstieg in der Gefäßdichte mit zunehmender Kulturdauer. Bereits nach vier Wochen Kultur konnten in allen untersuchten Läsionen von α -SMA-positiven Perizyten stabilisierte Gefäße nachgewiesen werden (Abb. 12C, D). Während nach subkutaner Transplantation eine etwa gleich bleibende Dichte

stabilisierter Gefäße über den Kulturzeitraum gezeigt werden konnte (Abb. 12C), stieg die Dichte stabilisierter Gefäße nach intraperitonealer Kultur über den beobachteten Zeitraum von bis zu zwölf Wochen in beiden Mausstämmen an (Abb. 12D). So zeigte sich in den Rag-1^{-/-}-Mäusen eine progrediente Perizytenrekrutierung der in die Läsionen eingewachsenen Gefäße von durchschnittlich 16,48 Gefäßanschnitte pro mm² nach acht Wochen auf durchschnittlich circa 34,61 Gefäßanschnitte pro mm² nach zwölfwöchiger Kultur (Abb. 12D). In dem in der Nacktmaus kultivierten Gewebe verdoppelte sich die Dichte der stabilisierten Gefäße von 10,04 α -SMA-positiven Gefäßanschnitten pro mm² nach acht Wochen auf 21,7 Gefäßanschnitte pro mm² nach zwölf Wochen.

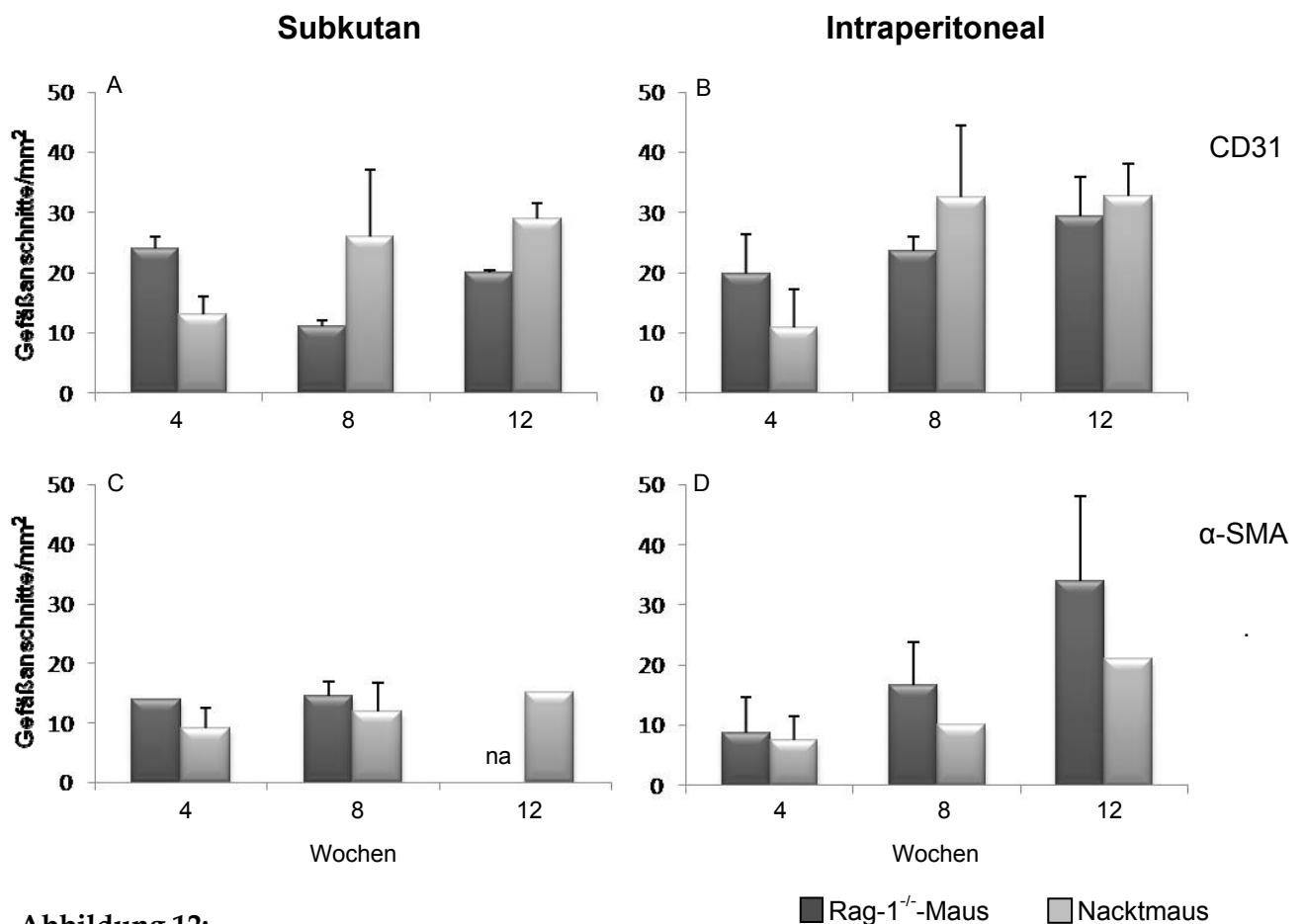


Abbildung 12:

Hämangiogenese: Durchschnittliche Anzahl CD31- (A, B) und α -SMA- (C, D) positiver Gefäßanschnitte/mm² in humanen Endometriumsfragmenten nach subkutaner (A, C) und intraperitonealer (B, D) Kultur über vier, acht und zwölf Wochen in Rag-1^{-/-}- und Nacktmäusen. Na = nicht auswertbar.

Um einen generellen Einfluss der Implantationslokalisation (s.c. und i.p.) sowie der verschiedenen Kulturperioden auf die Blutgefäßbildung und deren Stabilisierung in den endometrialen Herden zu analysieren, wurden die Dichten der CD31- sowie α -SMA-positiven Gefäße beider Mausstämme zusammengefasst (Abb. 13). Dabei zeigte sich eine stetige Zunahme CD31-positiver Gefäße mit fortschreitender Kulturdauer (Abb. 13A). Während nach vierwöchiger Kultur subkutan durchschnittlich 17,1 murine Gefäße/mm² in die humanen Läsionen eingewachsen waren, konnten intraperitoneal durchschnittlich 14,8 Gefäße/mm² identifiziert werden. Nach zwölfwöchiger Kultur ließen sich subkutan durchschnittlich 26,5, nach intraperitonealer Implantation durchschnittlich 31,8 CD31-positive Blutgefäße/mm² analysieren. Ein signifikanter Unterschied zwischen subkutan und intraperitoneal invadierenden Gefäße ließ sich dabei nicht verzeichnen. Die durchschnittliche Anzahl α -SMA-positiver Gefäße zeigte ebenfalls eine zunehmende Tendenz mit fortschreitender Kulturdauer (Abb. 13B). Dabei ließ sich mit 7,5 gefärbten Gefäßen/mm² nach vierwöchiger intraperitonealer Kultur und durchschnittlich 30,3 Gefäßen/mm² nach zwölfwöchiger intraperitonealer Kultur eine signifikante Zunahme der von Perizyten stabilisierten Gefäße über diesen Zeitraum beobachten.

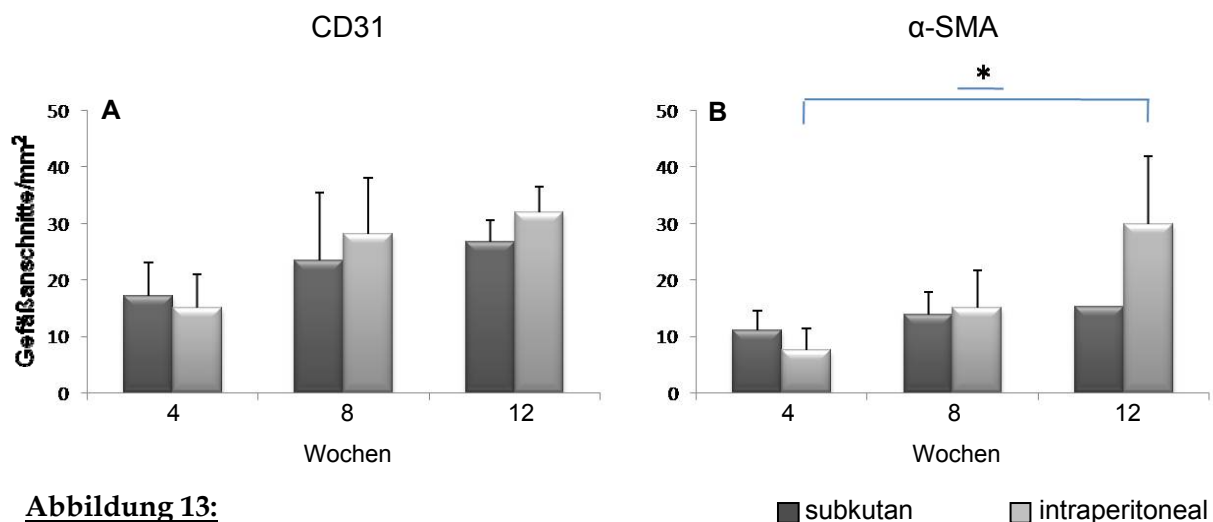


Abbildung 13:

Hämangiogenese beider Mausstämme zusammengefasst: Durchschnittliche Anzahl CD31- (A) und α -SMA- (B) positiver Gefäßanschnitte/mm² in humanen Endometriumsfragmenten nach subkutaner und intraperitonealer Kultur über vier, acht und zwölf Wochen. * = $p \leq 0,01$.

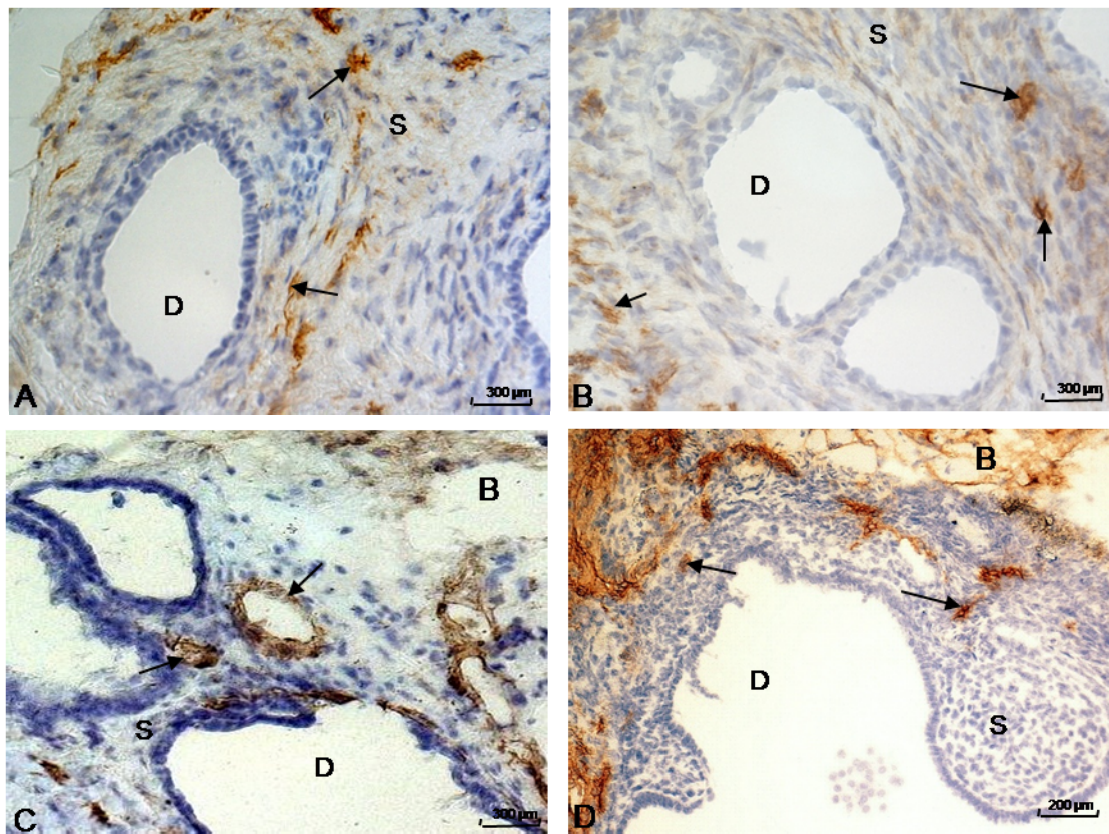
3.4.2 Lymphangiogenese

Die Lymphgefäßbildung in den subkutan und intraperitoneal implantierten endometrialen Läsionen wurde mit Hilfe des gegen den Hyaluronsäure-Rezeptor der Lymphgefäßendothelzellen gerichteten Antikörpers Lyve-1 detektiert und ebenfalls nach vier, acht und zwölf Wochen Kultur in beiden Mausstämmen analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach allen untersuchten Kulturperioden Lymphgefäße zu identifizieren waren (Abb. 14). Lyve-1-positive Gefäße ließen sich in subkutanen (Abb. 14A, C) sowie auch in intraperitonealen (Abb. 14B, D) Läsionen erkennen. Sie konnten dabei sowohl zentral im Fragment, als auch in der Adhäsionszone zwischen murinem und humanem Gewebe beobachtet werden.

Eine Quantifizierung der Lymphgefäße erfolgte durch Auszählung Lyve-1-positiver Gefäße in Relation zur Fläche der endometrialen Gewebefragmente.

Dabei zeigte sich in den subkutan implantierten endometrialen Läsionen beider Mausstämme über den gesamten beobachteten Kulturzeitraum nur eine geringe lymphogene Vaskularisierung mit durchschnittlich fünf bis zehn Lymphgefäßen pro Flächeneinheit (Abb. 15A).

Im Vergleich dazu konnte nach intraperitonealer Kultur eine deutlich stärkere lymphogene Angiogenese festgestellt werden (Abb. 15B). Hier zeigte sich bei in Rag-1^{-/-}-Mäusen implantierten Läsionen eine durchschnittliche Dichte Lyve-1-positiver Gefäße von 20 Gefäßanschnitten pro mm² nach vierwöchiger Kultur bis zu durchschnittlich 28,17 nach zwölfwöchiger Kulturdauer. Eine zunehmende Lymphangiogenese über den beobachteten Kulturzeitraum zeigten auch die intraperitoneal in der Nacktmaus kultivierten Läsionen von 5,1 bis 15,2 gefärbten Lymphgefäßen pro mm² (Abb. 15B).

**Abbildung 14:**

Lymphangiogenese in den subkutan (A, C) und intraperitoneal (B, D) implantierten endometrialen Läsionen. Darstellung der Lymphendothelien mittels eines Lyve-1-Antikörpers und einer Gegenfärbung mit Toulidinblau. A,B: nach vierwöchiger Kultur in der Nacktmaus; C,D: nach zwölfwöchiger Kultur in der Rag-1^{-/-}-Maus.

S = Endometriales Stroma, D = Endometriale Drüsen, Pfeile = Murine Lymphgefäße, B = Murines Bindegewebe.

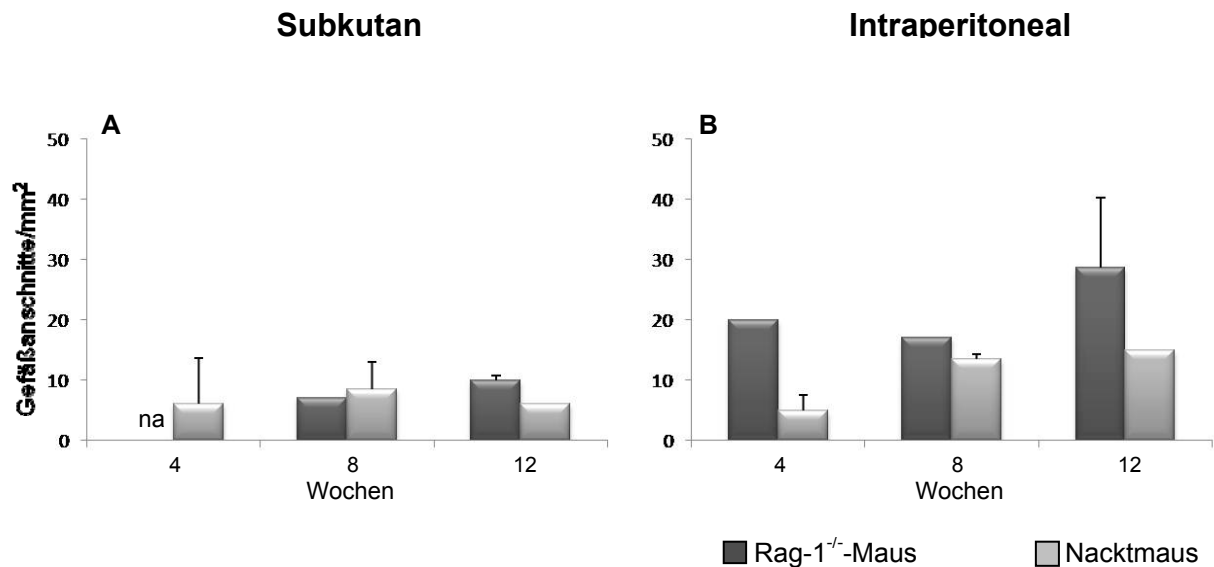


Abbildung 15:

Lymphangiogenese: Durchschnittliche Anzahl Lyve-1-positiver Gefäße pro Flächeneinheit in humanen Endometriumsfragmenten nach subkutaner (A) und intraperitonealer (B) Kultur über vier, acht und zwölf Wochen in der Rag-1^{-/-}-Maus und Nacktmaus. Na = nicht auswertbar.

Wie zuvor schon für die Blutgefäßbildung analysiert, wurden auch die Werte der Lymphangiogenese beider Mausstämme zusammengefasst und im Hinblick auf Unterschiede zwischen subkutaner und intraperitonealer Implantation nach unterschiedlicher Kulturdauer evaluiert (Abb. 16). Dabei ließ sich mit durchschnittlich 13,7 Gefäßanschnitten/mm² nach achtwöchiger und 25,6 Gefäßanschnitten/mm² nach zwölfwöchiger intraperitonealer Kultur eine signifikante Zunahme Lyve-1-positiver Gefäße über diesen Zeitraum nachweisen. Zudem konnte nach zwölfwöchiger Kultur mit durchschnittlich 25,6 Gefäßanschnitten/mm² eine signifikant stärkere Lymphgefäßdichte in intraperitonealen Herden gegenüber der Lymphgefäßdichte in subkutan implantierten Herden mit durchschnittlich 9,1 Gefäßanschnitten/mm² beobachtet werden.

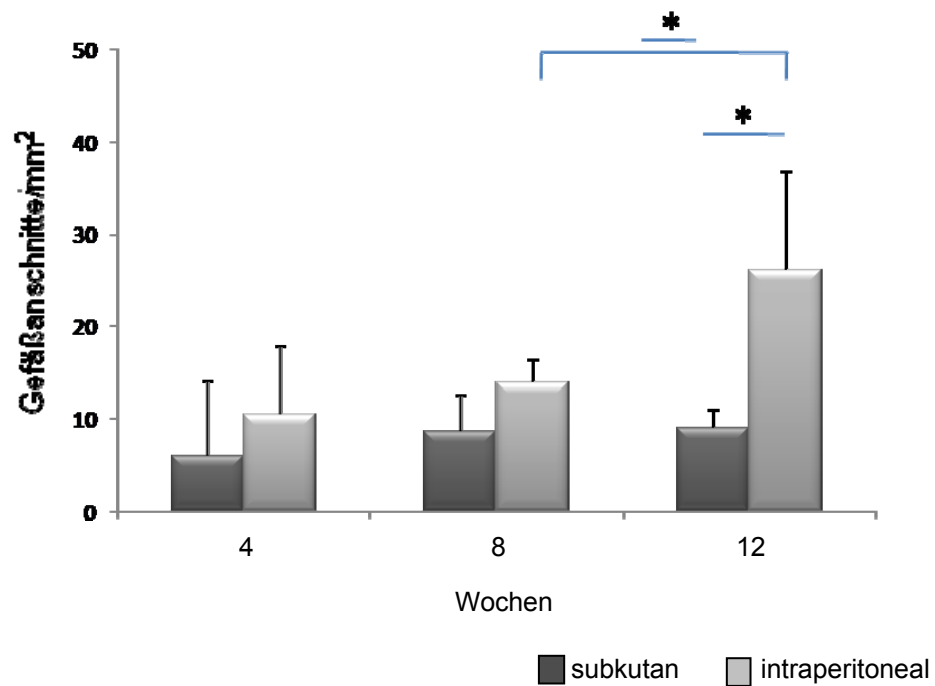


Abbildung 16:

Lymphangiogenese beider Mausstämme zusammengefasst: Durchschnittliche Anzahl Lyve-1-positiver Gefäße pro Flächeneinheit in humanen Endometriumsfragmenten nach subkutaner und intraperitonealer Kultur über vier, acht und zwölf Wochen. * = $p \leq 0,05$.

4 Diskussion

Die genauen Pathomechanismen der Endometriose sind nach wie vor weitgehend unbekannt, so dass spezifische Therapieoptionen bisher nicht verfügbar sind. Da diese Erkrankung spontan nur beim Menschen und menstruierenden nicht-humanen Primaten auftritt, wird die Untersuchung der Pathogenese der Endometriose sowie die Analyse möglicher Therapieansätze zunehmend in experimentellen Modellen anhand von Transplantationen von humanem Endometrium in immundefiziente Mäuse durchgeführt. Hier wird als Model vor allem die athyme Nacktmaus verwendet (Nisolle et al., 2000; Grümmer et al., 2001; Grümmer, 2006). In den bisherigen Arbeiten wurden die humanen Gewebefragmente entweder subkutan (Greenberg et al., 2004) oder intraperitoneal (Grümmer et al., 2001, Eggermont et al., 2005) implantiert. Diese Lokalisationen wurden in der vorliegenden Arbeit vergleichend analysiert, um zu untersuchen, ob diese einen Einfluss auf die Persistenz und die Angiogenese der ektopen Läsionen hat. Zudem wurde evaluiert, ob das Ausmaß der Defizienz des adaptiven Immunsystems des Wirtsorganismus einen Einfluss auf die Kulturdauer und die Angiogenese in dem ektopen humanem Gewebe hat. Hierzu wurde das humane Endometrium vergleichend in Rag-1^{-/-} und Nacktmäuse transplantiert. Während die Nacktmaus durch einen Mangel an T-Lymphozyten gekennzeichnet ist, weist die Rag-1^{-/-}-Maus auf Grund der Ausschaltung des Rekombinase-aktivierenden-Gens-1 (Rag-1), schwerwiegende Defizite sowohl im T-, als auch B-Lymphozytensystem auf (Janeway et al., 2001).

4.1 Persistenz und Morphologie der ektopen endometrialen Läsionen

Da in vorausgegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass von frei in die Bauchhöhle gegebenen endometrialen Gewebefragmenten nur circa 30 Prozent

dieser Fragmente als Läsionen wiedergefunden wurden (Bruner et al., 1997; Grümmer et al., 2001), wurden die Läsionen in der vorliegenden Studie sowohl subkutan als auch intraperitoneal mit Nahtgarn fixiert. Grümmer et al. (2001) konnten bereits zeigen, dass das Annähen dieser Läsionen zu einer Wiederfindungsrate von bis zu 100 Prozent nach neuntägiger und bis zu 66 Prozent nach 21-tägiger Kultur führte. In der hier vorliegenden Studie konnten diese Wiederfindungsraten nach Kultur des humanen endometrialen Gewebes in der Nacktmaus bestätigt werden. Dabei konnte sowohl subkutan, als auch intraperitoneal ein bedeutender Anteil der Fragmente wiedergefunden werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Nacktmaus zeigten sich in der Rag-1^{-/-}-Maus geringere Wiederfindungsraten nach subkutaner Kultur, jedoch ließen sich nach intraperitonealer Kultur bis zu acht Wochen mehr Läsionen detektieren.

Auch nach zwölfwöchiger Kultur wurde ein bedeutender Anteil der Fragmente noch wiedergefunden. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Mäusestämmen sowie der verschiedenen Implantationslokalisationen konnten nicht nachgewiesen werden. Ein Grund dafür, dass nicht alle implantierten Fragmente wiedergefunden werden konnten, ist möglicherweise durch die Invasivität dieser und somit einem vollständigen Einwachsen in murines Gewebe oder auch durch einen verstärkten Abbau des Gewebes bedingt.

Die insgesamt etwas niedrigeren Wiederfindungsraten in der Rag-1^{-/-}-Maus im Vergleich zur Nacktmaus lassen vermuten, dass eine möglicherweise nur eingeschränkte Rest-Funktion der spezifischen Abwehr vorliegt und diese zu einer Transplantatabstoßung führt. Das Recombinase-Activating-Gen (Rag) ist für die VDJ-Rekombination und damit für die Antigenvariabilität sowie Antikörperbildung verantwortlich (Janeway, 2001). Eine Ausschaltung dessen führt somit zu einer defizitären Immunabwehr sowohl auf zellulärer und damit T-Zell vermittelter Antigenpräsentation, als auch auf humoraler Ebene und damit Antikörper vermittelten Immunreaktion, dabei ist aber eine mögliche Rest-Funktion zu vermuten. Zudem spielen möglicherweise das funktionierende unspezifische

Abwehrsystem sowie die vorhandenen NK-Zellen beider verwendeter Mausstämme eine Rolle bei einer Transplantatabstoßung.

Da ein entwickeltes T-Zellsystem, darunter zytotoxische T-Zellen, für den Prozess der akuten Transplantatabstoßung obligat ist (Kaufmann, 2009), könnte der absolute Mangel an T-Lymphozyten durch ein Fehlen des Thymus eine höhere Wiederfindungsrate in der Nacktmaus begründen.

Zudem konnte ein Teil der intraperitoneal kultivierten Fragmente rein histologisch bestätigt werden, da sie auf Grund eines Einwachsens ins murine Peritoneum makroskopisch nicht sichtbar waren. Ein vollständiges Einwachsen des humanen Endometriums in das Gewebe der Maus kann unter anderem mit der in früheren Studien beobachteten ausgeprägten Invasivität des ektopen Gewebes erklärt werden (Wingfield et al., 1995; Jolicoeur et al., 1998; Leyendecker et al., 1998). Molekularbiologische Eigenschaften der Transplantate scheinen ebenfalls für die Invasion von Bedeutung zu sein. So sind vor allem die vom Endometrium exprimierten Zell-Adhäsions-Moleküle (Foidart et al., 1993) oder Matrix-Metallo-Proteinasen (Kokorine et al., 1997) für die Adhäsion der endometrialen Zellen am Peritoneum der Beckenorgane und der Bauchwand sowie die folgende Invasion in das Gewebe verantwortlich.

Auf Grund der intraperitoneal häufiger als subkutan beobachteten vollständigen Invasion des Endometriums sind zudem molekulare Eigenschaften des Peritoneums zu vermuten, welche über interzelluläre Mechanismen zu einer Adhäsion und Invasion des xenotopen Gewebes führen. Eine Rolle dabei könnten verschiedene, intraperitoneal nachgewiesene Wachstums- sowie immunologische Faktoren spielen (Ferrara et al., 2000). Diese könnten, neben einer intraperitoneal stärker vorhandenen Gefäßversorgung, auch für die Erhaltung der ektopen Läsionen relevant sein und somit zu einer höheren Wiederfindungsrate intraperitonealer Herde im Vergleich zu subkutan kultivierten Herden führen.

Die Größe der wiedergefundenen implantierten Endometriumfragmente nahm unabhängig von der Lokalisation und dem verwendeten Mausstamm nach vier Wochen ab, blieb dann aber über den weiteren Kulturverlauf weitgehend konstant.

Wäre die Reduktion der Läsionen auf eine Immunreaktion durch das unspezifische Abwehrsystem der Mäuse zurückzuführen, müsste sich dieser Prozess über den gesamten Kulturzeitraum erstrecken und zu einer zunehmenden Verkleinerung der Implantate führen. Im Widerspruch hierzu steht die weitgehende Größenkonstanz der Läsionen über den Zeitraum von vier bis zwölf Wochen. Möglicherweise ist für eine Verkleinerung der Herde eine nicht adäquate Blutversorgung dieser zu Beginn der Kultur verantwortlich. So würde eine anfängliche Mangelversorgung der Implantate zu einer Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung führen und über eine ischämisch bedingte Nekrotisierung zu einem partiellen Abbau der Läsionen durch u.a. Makrophagen führen. Um diesen Prozess belegen zu können, müssten genauere Analysen während der ersten vier Kulturwochen durchgeführt werden.

Zudem könnte die Invasivität des Endometriums zu einer Penetration in das Peritoneum, bzw. in die Haut der Mäuse führen und eine Ursache für die Verkleinerung der Läsionen sein.

Die morphologische Beurteilung der implantierten Läsionen zeigte eine gut erhaltene endometriale Struktur des kultivierten Gewebes. Unabhängig vom verwendeten Mausstamm, der Implantationslokalisation sowie der Kulturdauer waren endometriale Drüsen mit ausgebildetem Drüsenepithel, umgeben von endometrialem Stroma, zu beobachten. Auffällig waren die großen Drüsenlumina, welche durch eine weiterhin aktive Sekretionsleistung des transplantierten Endometriums erklärt werden können (Nisolle et al., 2000), kombiniert mit einem möglicherweise behinderten Sekretabfluss. Diese zystische Vergrößerung der Drüsenlumina konnte bereits nach einer Kulturdauer von fünf Tagen in humanem Menstruationsendometrium in der Nacktmaus festgestellt werden (Nisolle et al., 2000), bzw. nach zwei bis drei Wochen im Endometrium aus der Proliferations- und Sekretionsphase (Nisolle et al., 2000; Grümmer et al., 2001).

In früheren Studien konnten Grümmer et al. (2001) bereits nach zwei Tagen eine Adhäsion von frei in die Bauchhöhle der Maus eingebrachten endometrialen Läsionen an murinen Organen zeigen. In der vorliegenden Studie wurde die Adhäsion am Peritoneum zudem durch die vorherige Fixierung erleichtert. Ebenso

wie von Witz et al. (1999) und Nisolle et al. (2000) beschrieben, zeigte sich auch in der vorliegenden Studie ausschließlich eine Adhäsion von endometrialem Stroma an das Wirtsgewebe, es ließ sich jedoch keine direkte Adhäsion der endometrialen Drüsen an das murine Gewebe feststellen. Dennoch scheint das endometriale Drüsenepithel für die Adhäsion essentiell zu sein, da Nap et al. (2003) zeigen konnten, dass für die Adhäsion des endometrialen Gewebes eine Kombination aus Stroma und Drüsenepithel Voraussetzung war.

In dem CAM-Modell konnte die Penetration des Endometriums ins Wirtsgewebe bereits nach drei Tagen postimplantationem festgestellt werden (Nap et al., 2003 und 2004). In der vorliegenden Studie ließ sich eine stärkere Invasion intraperitonealer im Vergleich zu subkutanen Läsionen feststellen. Diese Beobachtung konnte durch die histologische Identifizierung eingewachsener und makroskopisch nicht mehr sichtbarer Fragmente bestätigt werden.

In früheren Studien wurde humanes Endometrium meist über einen Kulturzeitraum von bis zu vier Wochen in Nacktmäusen kultiviert (Grümmer, 2008). Nicht geklärt war, ob längere Kulturperioden in der Nacktmaus auf Grund der vorhandenen B-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen möglich sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Defekte im T-Zellsystem der Nacktmaus ausreichend sind, um heterologes Endometriumgewebe über einen prolongierten Kulturzeitraum von bis zu zwölf Wochen zu kultivieren. Basierend auf den Beobachtungen dieser Studie, erwies sich die Rag-1^{-/-}-Maus nicht als vorteilhaft gegenüber der Nacktmaus im Hinblick auf die untersuchten Parameter.

Dass ein Teil der Läsionen in beiden Mausstämmen nicht wiedergefunden werden konnte, ist vermutlich neben einer möglichen Rest-Funktion der humoralen Abwehr in der Rag-1^{-/-}-Maus, bzw. neben funktionierenden B-Zellen der Nacktmaus, vor allem auf eine vorhandene und funktionierende angeborene Immunabwehr zurückzuführen. So kommt vor allem den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie den Makrophagen für einen beginnenden Abstoßungsprozess eine besondere Bedeutung zu. Zudem ist bekannt, dass wirtseigene NK-Zellen für die hyperakute Transplantatabstoßungsreaktion eine Rolle spielen und Makrophagen während der

chronischen Abstoßung für die Präsentation von Antigenen verantwortlich sind (Oberholzer et al., 2001). Somit könnten diese Mechanismen zusammen mit einer Rest-Funktion der humoralen und zellulären Abwehr einen möglichen Abstoßungsprozess fördern. Im Hinblick auf die immunologische Situation in Endometriosepatientinnen ist bekannt, dass eine gestörte Funktion des unspezifischen Abwehrsystems vorliegt, welche wahrscheinlich eine bedeutende Rolle für die Ausbildung sowie die Persistenz der Herde spielt. So konnte in der Peritonealflüssigkeit der Patientinnen im Vergleich zu selbiger gesunder Frauen u.a. eine erhöhte Konzentration von Makrophagen beobachtet werden, welche durch eine vermehrte Produktion von Interleukin-8 und Tumornekrosefaktor- α (Montagna et al., 2008) für eine Proliferation sowie eine Adhäsion von endometrialen Zellen verantwortlich sind (Arici et al., 1998). Weiterhin wurde eine herabgesetzte zytotoxische Aktivität von Natürlichen Killerzellen beobachtet (Vinatier et al., 1996). Dennoch kommt den T-Helferzellen, bzw. T-Killerzellen bei der host-versus-graft-Reaktion die wichtigste Bedeutung zu, so dass in beiden in dieser Arbeit verwendeten Mausstämmen eine Transplantatabstoßung vermutlich nur eingeschränkt erfolgen kann. Diese These lässt sich durch die beobachtete Wiederfindungsrate mit einem bedeutenden Anteil detektierter Läsionen stützen. Interessanterweise konnte auch in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen eine herabgesetzte T-Zell-Toxizität nachgewiesen werden (Harada et al., 2001). Bis heute ist nicht geklärt, ob der inflammatorische Zustand in der Peritonealhöhle von Endometriosepatientinnen eine Ursache oder eine Folge der Ausbildung der Erkrankung ist (Nowak et al., 2008). So könnten die in dieser Studie verwendeten Mausmodelle, welche über eine uneingeschränkte Funktion des angeborenen Immunsystems verfügen, möglicherweise geeignet sein, einen potentiellen Einfluss der ektopen endometrialen Läsionen auf das unspezifische Abwehrsystem zu analysieren. Dabei sollte vor allem das autologe Tier-Modell zur Verwendung kommen.

4.2 Hämangiogenese in den ektopen Läsionen

Die Bildung neuer Blutgefäße ist essentiell für die Entwicklung und Persistenz von ektopen Endometrioseherden (Donnez et al., 1998; Abulafia und Scherer, 1999; Fujishita et al., 1999; Groothuis et al., 2005). Auch in dem hier verwendeten Mausmodell ließ sich, durch in den humanen endometrialen Läsionen nachgewiesenen murinen Gefäßen, ein Anschluss an das Blutgefäßsystem beobachten. Im Nacktmausmodell konnte gezeigt werden, dass die Invasion muriner Gefäße in die ektopen endometrialen Herde ab Tag vier bis fünf posttransplantationem beginnt (Grümmer et al., 2001; Eggermont et al., 2005), wobei es zu einem progressiven Verschwinden humaner Endothelzellen von Tag drei bis Tag zehn in dem humanem Endometrium kommt (Eggermont et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit ließ sich eine Blutgefäßinvasion muriner Herkunft in die ektopen endometrialen Läsionen auch in der Rag-1^{-/-}-Maus nachweisen. Bis zu einer Kulturdauer von zwölf Wochen konnten murine Gefäße sowohl nach subkutaner als auch nach intraperitonealer Kultur in dem ektopen humanen Endometrium dargestellt werden, unabhängig vom verwendeten Mausstamm. Korrelierend mit den Beobachtungen von Donnez et al. (1998), Taylor et al. (2002) und Groothuis et al. (2005), dass ektipe endometriale Herde auf eine adäquate Blutgefäßversorgung angewiesen sind, ließ sich somit auch in der vorliegenden Arbeit eine ausgeprägte Gefäßversorgung darstellen. Die Abhängigkeit der Entstehung endometrialer Läsionen von einer ausreichenden Vaskularisation konnte zuvor von Nap et al. (2004) durch eine spezifische Hemmung der Blutgefäßbildung belegt werden. So reduzierte sich die Anzahl ektoper humaner endometrialer Herde nach Behandlung mit den Angiogenesehemmern TNP-470, Endostatin und Anginex im Nacktmausmodell.

Einen späteren Schritt bei der Blutgefäßformation stellt die Rekrutierung von Perizyten dar, welche zu einer Stabilisierung der Gefäße führt. In der hier vorliegenden Studie zeigte sich bereits nach vierwöchiger Kultur eine Bildung von alpha-smooth-muscle-actin-(α -SMA)positiven Gefäßen sowohl in den subkutanen,

als auch in den intraperitonealen Fragmenten beider Mausstämme. Eine Zunahme der von Perizyten umgebenen Gefäße war nach zwölfwöchiger Kultur vor allem in intraperitonealen Herden in der Rag-1^{-/-}-Maus zu beobachten.

Die hier nachgewiesene Neubildung von Blutgefäßen in den ektopen endometrialen Läsionen sichert deren Persistenz. Eine in den nicht wiedergefundenen Herden mangelnde Gefäßversorgung könnte zu einer Degeneration dieser geführt haben und eine Erklärungsmöglichkeit für die eingeschränkte Wiederfindungsrate sein. Die höhere Dichte CD31-positiver Gefäße sowohl in subkutan sowie in intraperitoneal kultivierten Fragmenten bis zu acht Wochen Kultur im Vergleich zu α -SMA-positiven Gefäßen kann eine starke angiogene Aktivität in diesem Zeitraum widerspiegeln, da CD31 vor allem auch als Marker für die beginnende und frühe Angiogenese bekannt ist (Albeida et al., 1990). Im Kulturzeitraum von acht bis zwölf Wochen zeigte sich keine Zunahme der CD31-positiven Blutgefäßbildung mehr, während tendenziell eine verstärkte Stabilisierung der Endothelien durch Perizyten zu beobachten war. Dies könnte durch Studien von Conway et al. (2001) erklärt werden, die eine reduzierte angiogene Potenz von Perizyten-umgebener Blutgefäße zeigen konnten. Somit könnte auch in der hier vorliegenden Studie die Formation neuer Gefäße mit zunehmender Stabilisierung der Gefäße stagnieren. Der Zeitpunkt der in beiden Mausstämmen beobachteten Bildung von Perizyten korreliert mit den Ergebnissen früherer Studien, worin eine beginnende Stabilisierung gebildeter Gefäße in endometrialem Gewebe nach circa fünf Wochen postimplantationem beschrieben wird (Groothuis et al., 2005). Diese Stabilisierung steigt mit zunehmender Kulturdauer in der hier vorliegenden Studie und war nach zwölf Wochen in intraperitoneal implantierten endometrialen Läsionen stärker ausgeprägt als in subkutan kultivierten Läsionen. Zudem konnte die Zusammenfassung der Werte beider Mausstämme eine signifikante Zunahme α -SMA-positiver Gefäße im Zeitraum von vier bis zu zwölf Wochen nach intraperitonealer Kultur zeigen.

Eine Ursache für diese hier beobachtete tendenziell stärkere Angiogenese intraperitonealer Läsionen im Vergleich zu subkutanen Implantaten könnte auf einer in der Peritonealflüssigkeit erhöhten Konzentration an Wachstumsfaktoren,

wie VEGF (Ferrara et al., 2000), der als wichtigster proangiogenetischer Faktor im Endometrium gilt (Girling und Rogers et al., 2005) und PDGF (Inui et al., 1994) basieren, die die Bildung von Blutgefäßen fördern.

Zudem könnte die Rekrutierung von Perizyten in der Peritonealhöhle dadurch erleichtert sein, dass sich Perizyten auch aus Makrophagen differenzieren können, die in großer Zahl in der Peritonealhöhle vorhanden sind (Groothuis et al., 2005). Nicht geklärt ist, ob eine stärkere Stabilisierung der Gefäße zu einer zunehmenden Persistenz der endometrialen Läsionen führen kann. Hierzu gibt es Hinweise aus früheren Studien, die zeigen, dass durch Perizyten-stabilisierte Gefäße inaktiv und unerreichbar für antiangiogene Faktoren sind (Conway et al., 2001; Nap et al., 2004; van Langendonck et al., 2008) und somit eine stabile Gefäßversorgung zur Erhaltung der Läsionen vorhanden ist.

Im Vergleich der Transplantationen in die beiden unterschiedlich immundefizienten Mausstämme konnte kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Angiogenese in dem humanen Endometriumgewebe beobachtet werden. Tendenziell zeigte sich jedoch eine etwas größere Dichte CD31-positiver Gefäße in subkutanen Herden in der Nacktmaus sowie α -SMA-positiver Gefäße in intraperitonealen Herden der Rag-1^{-/-}-Maus. Ob dies durch den unterschiedlichen Schweregrad der Immundefizienz bedingt ist, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Generell werden Endometrioseherde auf Grund ihres zeitlichen Auftretens sowie ihrer Gefäßversorgung in unterschiedliche Aktivitätsstadien eingeteilt. Hier unterscheidet man rote, schwarze und weiße Läsionen (American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Medicine classification of Endometriosis, 1997). So könnte dementsprechend der Zustand in der Nacktmaus mit dem frühen und instabilen Stadium der Endometriose verglichen werden. Dieses wird durch die sogenannten roten Läsionen repräsentiert (Donnez et al., 1994), welche eine hohe angiogene Aktivität besitzen, bei einer geringen α -SMA-Positivität.

Im Gegensatz dazu könnte die tendenziell vermehrte Anzahl α -SMA-positiver Gefäße und die tendenziell etwas geringere angiogene Potenz in der Rag-1^{-/-}-Maus

eher dem fortgeschrittenerem manifesten Stadium der Endometriose entsprechen (Schweppe et al., 2002; Groothuis et al., 2005). Dieses ist durch die sogenannten braunen oder schwarzen Läsionen gekennzeichnet, welche ausgereifte Gefäße charakterisieren (Matzusaki et al., 2001). Da der genaue Zeitverlauf der Stadiumsentwicklung bisher nicht geklärt ist und auf Grund der eingeschränkten Fallzahlen können diese Aussagen hier nur als Spekulationen angesehen werden. Dennoch könnten diese Vermutungen auf Unterschiede im Schweregrad der Immundefizienz beider Mausstämmen zurückzuführen sein. So könnte die Stabilisierung und Persistenz von heterologem Gewebe in der Rag-1^{-/-}-Maus, auf Grund ihrer schweren Einschränkungen im T- sowie B-Lymphozytensystem im Vergleich zur ausschließlich T-Zell-defizitären Nacktmaus, erleichtert sein, während in der Nacktmaus, vor allem auf Grund des intakten B-Lymphozytensystems, eine verzögerte Immunreaktion eintreten könnte.

Die in der hier vorliegenden Studie gezeigte Vaskularisierung der implantierten endometrialen Läsionen in beiden Mausstämmen kann für zukünftige Analysen im Hinblick auf die Evaluation therapeutischer Ansätze zur Behandlung der Endometriose von Bedeutung sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass das humane Endometriumgewebe während einer Kulturdauer von bis zu zwölf Wochen neben einer gut erhaltenen Morphologie auch eine ausreichende Gefäßversorgung sowie Stabilisierung der Gefäße aufweist. So könnte in diesen experimentellen Modellen der Effekt antiangiogener Substanzen analysiert werden. In dieser Hinsicht könnte auch der Einsatz der bereits von Van Langendonck et al. (2008) als zukünftige Therapieoption bei Endometriose diskutierten Vascular-disrupting-agents, welche eine antiangiogene Potenz bei der Behandlung von bereits von Perizyten-umgebenen Gefäßen aufweisen, interessant sein. Mönckedieck et al. (2009) konnten nachweisen, dass auch Progestine einen hemmenden Einfluss auf die Expression angiogener Faktoren sowie von Matrix-Metallo-Proteinasen in ektopischen endometrialen Läsionen haben. Auf Grund der im Menschen sich meist über mehrere Monate bis Jahre entwickelnden Erkrankung und damit vermutlich zunehmenden Anzahl Perizyten-stabilsierter Gefäße in den Läsionen sollten weitere

Analysen hierzu durchgeführt werden. Zudem konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass diese Mausmodelle durch die gut erhaltene Morphologie sowie eine ausreichende Gefäßversorgung geeignet sind, auch längerfristige Versuchsreihen von bis zu zwölf Wochen zur Evaluation neuer Therapieansätze durchzuführen.

4.3 Lymphangiogenese in den ektopen Läsionen

Möglicherweise spielt auch die Lymphangiogenese eine Rolle in der Pathogenese der Endometriose. So konnten Nisolle et al. (2008) eine Invasion lymphatischer Gefäße in tief infiltrierenden endometriotischen Läsionen im Menschen nachweisen. Bis heute gibt es jedoch nur wenige Studien zur lymphogenen Vaskularisierung des Endometriums sowie von endometriotischen Herden (Koukourakis et al., 2005; Red-Horse et al., 2006; Donoghue et al., 2007). Während die Studien von Red-Horse et al. (2006) keine endometriale Lymphangiogenese zeigen konnten, wiesen Rogers et al. (2008) Lymphgefäße im Endometrium nach. Nisolle et al. (2008) konnten eine juxtaglanduläre Lokalisation der Lymphgefäße, entsprechend der Verteilung der Blutgefäße in den Endometrioseherden, beobachten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Invasion muriner lymphatischer Gefäße in humanes transplantiertes Endometrium untersucht. Dabei konnte in allen untersuchten Läsionen eine lymphogene Vaskularisierung nachgewiesen werden, deren Ausmaß von der Lokalisation der Läsionen abhängig war. Sowohl subkutan als auch intraperitoneal ließen sich nach allen Untersuchungszeiträumen in beiden Mausstämmen Lyve-1-positive Gefäße detektieren. Die Zusammenfassung der Werte beider Mausstämme zeigte zudem eine signifikante Steigerung der Lymphgefäßinvasion im Kulturzeitraum von acht zu zwölf Wochen in den intraperitoneal implantierten Herden sowie eine signifikant stärkere lymphogene Penetration in intraperitonealen im Vergleich zu subkutan kultivierten Läsionen.

Insgesamt konnten diese Ergebnisse zeigen, dass eine Invasion von Lymphgefäßen bereits nach vier Wochen subkutaner bzw. intraperitonealer Kultur von humanem

Endometrium erfolgte. Die murine Herkunft der detektierten Lymphgefäße lässt auf eine vorhandene lymphangiogene Potenz des humanen endometrialen Gewebes schließen, die zu einem Einwachsen der Lymphgefäße führt. Es ist bekannt, dass dieser Prozess durch eine Expression verschiedener Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF (Ferrara, 2000), getriggert wird. Im Rahmen der Lymphgefäßformation sind vor allem VEGF-C und -D sowie deren Rezeptor VEGFR-3 von Bedeutung (Kaipainen et al., 1995).

Auf Grund der in der Peritonealflüssigkeit hohen Konzentration an angiogenen Wachstumsfaktoren (Ramey und Archer, 1993) wird eine Häm- und Lymphangiogenese begünstigt, so dass hierin ein Grund für die stärkere Lymphangiogenese in den intraperitoneal implantierten Läsionen liegen könnte. Bekannt ist, dass in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen im Vergleich zu gesunden Frauen eine erhöhte Konzentration hämangiogener Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF-A (McLaren und Prentice et al., 1996) vorliegt. Zudem konnten Takehara et al. (2004) eine erhöhte Konzentration des lymphangiogenen Faktors VEGF-C in ovariellen Endometriomen nachweisen. Die Beobachtungen dieser sowie der hier vorliegenden Studie könnten möglicherweise die Bedeutung der Lymphangiogenese für die Pathogenese der Endometriose bestärken.

Die geringe Ausprägung der Lymphogenese in den subkutanen Herden lässt sich möglicherweise auf die anatomische Entfernung zu den Hauptstämmen des Lymphsystems, der Cisterna chyli, sowie des Ductus thoracicus zurückführen. Da Lymphgefäße in der Peripherie ihren Ursprung nehmen, könnte der Anschluss dieser an die zuvor erwähnten Hauptstämme erschwert sein und zu einer Reduzierung der Lymphgefäße führen.

Möglicherweise spielt auch der physiologische zeitliche Ablauf der Blut- und Lymphgefäßentwicklung eine Rolle. So ist bekannt, dass die Bildung von Lymphgefäßen nach der Reifung und damit Stabilisierung der Blutgefäße durch Perizyten beginnt (Sadler, 2003). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den subkutanen Läsionen eine etwas geringe Dichte von Gefäßen, die durch Perizyten

stabilisiert waren, so dass hierdurch möglicherweise auch die Lymphangiogenese verzögert war, während die verstärkte Invasion lymphogener Gefäße nach intraperitonealer Implantation durch eine erhöhte Anzahl Perizyten-stabilsierter Blutgefäße begünstigt sein könnte. Die in beiden Mausstämmen eher geringe Lymphgefäßbildung kann zudem darauf zurückzuführen sein, dass das transplantierte Endometrium auf Grund der Gewinnung durch Abrasionen vor allem aus dem Stratum functionale besteht. So beschrieben Rogers et al., (2008) nur schmale und spärlich verteilte Gefäße in der Funktionalis im Vergleich zu einer vier bis fünf mal stärkeren Lymphangiogenese in der Basalis. Möglicherweise erleichtert eine reduzierte lymphatische Vaskularisierung in der Funktionalis eine Implantation und die Erhaltung einer Schwangerschaft (Rogers et al., 2008).

Die Rolle des Lymphgefäßsystems für die Endometriose ist bisher völlig unbekannt. Möglicherweise könnte durch die Elimination zellulärer und azellulärer Abfallstoffe ein adäquater Lymphabfluss für die Persistenz der endometrialen Herde von Bedeutung sein. Zum anderen könnten durch die Ausbildung von Blut- und Lymphgefäßen die Zellen der unspezifischen Abwehr folglich das fremde Gewebe leichter erreichen. Auch diese Annahmen müssen durch umfangreichere Studien untersucht werden.

Ob die lymphogene Vaskularisierung der ektopen endometrialen Herde pathogenetisch von Bedeutung ist, muss in weiterführenden Untersuchungen, z.B. durch eine selektive Hemmung der Lymphgefäßbildung, analysiert werden. Solche Erkenntnisse zur Lymphangiogenese könnten zukünftig zur Entwicklung neuer Therapieansätze für die Behandlung der Endometriose führen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde das Wachstum und die Angiogenese von ektopem humanem Endometrium in zwei Mausstämmen mit unterschiedlich defizitärem adaptiven Immunsystem analysiert. Hierzu wurde humanes Endometrium subkutan und intraperitoneal zum einen in athymen T-Zell-defiziente Nacktmäuse, zum anderen Rekombinase-aktivierendes-Gen-1^{-/-}-Mäuse, die zusätzlich einen B-Zell-Defekt ausweisen, transplantiert und über einen Zeitraum von bis zu zwölf Wochen kultiviert. Nach vier, acht und zwölf Wochen Kultur wurden Größe, Wiederfindungsrate und Morphologie der ektopen Läsionen sowie die Häm- und Lymphangiogenese in dem humanen Endometriumgewebe analysiert. Die Wiederfindungsrate lag etwa zwischen 40 und 80 Prozent der implantierten Läsionen. In beiden Mausstämmen zeigte sich eine gut erhaltene Morphologie sowie eine hämatogene und lymphogene Vaskularisierung des humanen endometrialen Gewebes über einen Zeitraum von bis zu zwölf Wochen. Im Vergleich der beiden unterschiedlich immundefizienten Mausstämme ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Dichte Cluster of Differentiation31-positiver neu gebildeter Gefäße sowie in der Dichte α -Smooth-Muscle-Actin-positiver, das heisst durch Perizyten stabilisierter Gefäße beobachten. Nach intraperitonealer Transplantation zeigte sich eine stärkere Zunahme Perizyten-positiver Gefäßen sowie eine deutlichere Lymphgefäßbildung über den beobachteten Zeitraum im Vergleich zur subkutanen Transplantation. In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass ektoper humane endometriale Läsionen über einen Zeitraum von bis zu zwölf Wochen in Nacktmäusen und in Rekombinase-aktivierendes-Gen-1^{-/-}-Mäusen gleichermaßen persistieren und eine Häm- und Lymphangiogenese induzieren. Somit können diese experimentellen Endometriosemodelle für die Evaluation neuer therapeutischer Ansätze für die Behandlung dieser Erkrankung auch über einen längeren Zeitraum von bis zu zwölf Wochen eingesetzt werden.

6 Literaturverzeichnis

- 1 **Abbott, J., Hawe, J., Hunter, D., Holmes, M., Finn, P., Garry, R., (2004):**
Laparoscopic excision of endometriosis: a randomized, placebo-controlled trial.
Fertil. Steril., 82(4), 878-84.
- 2 **Abulafia, O., Sherer, D.M., (1999):**
Angiogenesis of the endometrium.
Obstet. Gynecol. Rev., 94, 148-153.
- 3 **Albeida, S.M., Oliver, P.D., Romer, L.H., Buck, C.A., (1990):**
Endo CAM: A novel endothelial adhesion molecule.
J. Cell Biology, 110, 1227-1237.
- 4 **American Fertility Society, (1985):**
Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis.
Fertil. Steril., 43, 351-352.
- 5 **Aoki, D., Katsuki, Y., Shimizu, A., Kakinuma, C., Nozawa, S., (1994):**
Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice.
Obstet. Gynecol., 83(2), 220-8.
- 6 **Arici, A., Seli, E., Senturk, L.M., Gutierrez, L.S., Oral, E., Taylor, H.S., (1998):**
Interleukin-8 in the human endometrium.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 83(5), 1783-7.
- 7 **Attar, E., Bulun, S.E., (2006):**
Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis?
Fertil. Steril., 85(5), 1307-18. Review.
- 8 **Béliard, A., Donnez, J., Nisolle, M., Foidart, J.-M., (1997):**
Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis.
Fertil. Steril., 67, 266-272.
- 9 **Béliard, A., Noël, A., Goffin, F., Frankenne, F., Foidart, J.M., (2002):**
Role of endocrine status and cell type in adhesion of human endometrial cells to the peritoneum in nude mice.
Fertil. Steril., 78(5), 973-8.
- 10 **Berkkanoglu, M., Arici, A., (2003):**
Immunology and endometriosis.
Am. J. Reprod. Immunol., 50, 48-59.
- 11 **Blackwell, P.M., Fraser, I.S., (1981):**
Superficial lymphatics in the functional zone of normal human endometrium.
Microvasc. Res., 21(2), 142-52.

- 12 **Bourlev, V., Volkov, N., Pavlovitch, S., Lets, N., Larsson, A., Olovsson, M., (2006):**
The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions.
Reproduction, 132(3), 501-9.
- 13 **Bruner, K.L., Matrisian, L.M., Rodgers, W.H., Gorstein, F., Osteen, K.G., (1997):**
Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice.
J. Clin. Invest., 99, 2851-2857.
- 14 **Bulun, S.E., Zeitoun, K.M., Takayama, K., Sasano, H., (Review 2000):**
Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance.
J. Mol. Endocrinol., 25(1), 35-42.
- 15 **Chwalisz, K., Hegele-Hartung, C., Fritzemeier, K.H., Beier, H.M., Elger, W., (1991):**
Inhibition of the estradiol-mediated endometrial gland formation by the antigestagen onapristone in rabbits: Relationship to uterine estrogen receptors.
Endocrinology, 129, 312-322.
- 16 **Conway, E.M., Collen, D., Carmeliet, P., (2001):**
Molecular mechanisms of blood vessel growth.
Cardiovasc Res., 49(3), 507-21. Review.
- 17 **Defrère, S., Van Langendonckt, A., González Ramos, R., Jouret, M., Mettlen, M., Donnez, J., (2006):**
Quantification of endometriotic lesions in a murine model by fluorimetric and morphometric analyses.
Hum. Reprod., 21(3), 810-7.
- 18 **D'Hooghe, T.M., Hill, J.A., (1996):** Immunobiology of endometriosis.
In: Bronston R, Anderson DJ (Ed.):
Immunology of reproduction; S. 322-356.
Cambridge: Blackwell Scientific.
- 19 **D'Hooghe, T.M., Debrock, S., Meuleman, C., Hill, J.A., Mwenda, J.M., (2003):**
Future directions in endometriosis research.
Obstet. Gynecol. Clin. North Am., 30(1), 221-44. Review.
- 20 **Dizerega, G.S., Barber, D.L., Hodgen, G.D., (1980):**
Endometriosis : Role of ovarian steroids in initiation, maintenance and suppression.
Fertil. Steril., 33, 649-653.
- 21 **Donnez, J., Nisolle-Pochet, M., Casanas-Roux, F., (1990):**
Endometriosis-associated infertility: evaluation of preoperative use of danazol, gestrinone, and buserelin.
Int. J. Fertil., 35(5), 297-301.

- 22 **Donnez, J., Nisolle, M., Casanas-Roux, F., (1994):**
Peritoneal endometriosis: two-dimensional and three-dimensional evaluation of typical and subtle lesions.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 734, 342-51.
- 23 **Donnez, J., Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Brion, P., Da Costa Ferreira, N., (1996):**
Stereometric evaluation of peritoneal endometriosis and endometriotic nodules of the rectovaginal septum.
Hum. Reprod., 11(1), 224-8.
- 24 **Donnez, J., Smoes, P., Gillerot, S., Casanas-Roux, F., Nisolle, M., (1998):**
Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis.
Hum. Reprod., 13, 1686-1690.
- 25 **Donoghue, J.F., Lederman, F.L., Susil, B.J., Rogers, P.A., (2007):**
Lymphangiogenesis of normal endometrium and endometrial adenocarcinoma.
Hum. Reprod., 22(6), 1705-13.
- 26 **Dunselman, G.A., Willebrand, D., Land, J.A., Bouckaert, P.X., Evers, J.L., (1989):**
A rabbit model of endometriosis.
Gynecol. Obstet. Invest., 27, 29-33.
- 27 **Efstathiou, J.A., Sampson, D.A., Levine, Z., Rohan, R.M., Zurakowski, D., Folkman, J., D'Amato, R.J., Rupnick, M.A., (2005):**
Nonsteroidal antiinflammatory drugs differentially suppress endometriosis in a murine model.
Fertil. Steril., 83(1), 171-81.
- 28 **Eggermont, J., Donnez, J., Casanas-Roux, F., Scholtes, H., Van Langendonck, A., (2005):**
Time course of pelvic endometriotic lesion revascularization in a nude mouse model.
Fertil Steril., 84(2), 492-9.
- 29 **Fainaru, O., Adini, A., Benny, O., Adini, I., Short, S., Bazinet, L., Nakai, K., Pravda, E., Hornstein, M.D., D'Amato, R.J., Folkman, J., (2008):**
Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis.
FASEB J., 22(2), 522-9.
- 30 **Farquhar, C.M., (2000):**
Extracts from the "clinical evidence". Endometriosis.
BMJ., 320(7247), 1449-52. Review.
- 31 **Fazleabas, A.T., (2005):**
A baboon model for inducing endometriosis.
Methods Mol. Med., 121, 95-9.

-
- 32 **Ferrara, N. (2000):**
VEGF: an update on biological and therapeutic aspects.
Curr. Opin. Biotechnol., 11(6), 617-624.
- 33 **Findlay, J.K., (1986):**
Angiogenesis in reproductive tissues.
J. Endocrinol., 111, 357-366.
- 34 **Foidart, J.M., (1993):**
Physiology of the pregnant woman and risk factors.
Contracept. Fertil. Sex., 21(11), 811-5. Review.
- 35 **Folkman, J., (1990):**
What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?
J. Natl. Cancer Inst., 82, 4-6.
- 36 **Folkman, J., Shing, Y., (1992):**
Angiogenesis.
J. Biol. Chem., 267, 10931-10934.
- 37 **Folkman, J., (1995):**
Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis.
N. Engl. J. Med., 333(26), 1757-63.
- 38 **Fujishita, A., Hasuo, A., Khan, K.N., Masuzaki, H., Nakashima, H., Ishimaru, T., (1999):**
Immunohistochemical study of angiogenic factors in endometrium and endometriosis.
Gynecol. Obstet. Invest., 48, 36-44.
- 39 **Girling, J.E., Rogers, P.A., (2005):**
Recent advances in endometrial angiogenesis research.
Angiogenesis, 8(2), 89-99. 7. Review.
- 40 **Giudice, L.C., Kao, L.C., (2004):**
Endometriosis.
Lancet, 364(9447), 1789-99.
- 41 **Gordon, J.D., Shifren, J.L., Foulk, R.A., Taylor, R.N., Jaffe, R.B., (1995):**
Angiogenesis in the human female reproductive tract.
Obstet. Gynecol. Surv., 50(9), 688-97.
- 42 **Greenberg, L.H., Slayden, O.D., (2004):**
Human endometriotic xenografts in immunodeficient RAG-2/gamma(c)KO mice.
Am. J. Obstet. Gynecol., 190(6), 1788-95; discussion 1795-6.
- 43 **Groothuis, P.G., Nap, A.W., Winterhager, E., Grümmer, R., (2005):**
Vascular development in endometriosis.
Angiogenesis, 8(2), 147-56.

- 44 **Grümmer, R., Schwarzer, F., Bainsczyk, K., Hess-Stumpp, H., Regidor, P.A., Schindler, A.E., Winterhager, E., (2001):**
Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model.
Hum. Reprod., 16(8), 1736-43.
- 45 **Grümmer, R., (2006):**
Animal models in endometriosis research.
Hum. Reprod. Update, 12(5), 641-9. Review.
- 46 **Grümmer, R.,(2008):**
Nonprimate experimental models in endometriosis research.
In: Rombauts L, Tsaltas J, Maher P, Healy D (Eds.):
Endometriosis 2008. S. 109-116.
USA: Blackwell Publishing
- 47 **Gruppo italiano per lo studio dell'endometriosi (1994):**
Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with
selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study.
Hum. Reprod., 9, 1158-1162.
- 48 **Halme, J., Hammond, M.G., Hulka, J.F., Shailaja, G.R., Talbert, L.M., (1984):**
Retrograde menstruation in healthy women and in patients with
endometriosis.
Obstet. and Gynecol., 64, 151-154.
- 49 **Harada, T., Iwabe, T., Terakawa, N., (2001):**
Role of cytokines in endometriosis.
Fertil. Steril., 76(1), 1-10. Review.
- 50 **Hirata, T., Osuga, Y., Yoshino, O., Hirota, Y., Harada, M., Takemura, Y.,
Morimoto, C., Koga, K., Yano, T., Tsutsumi, O., Taketani, Y., (2005):**
Development of an experimental model of endometriosis using mice that
ubiquitously express green fluorescent protein.
Hum. Reprod., 20(8), 2092-6.
- 51 **Hull, M.L., Charnock-Jones, D.S., Chan, C.L., Bruner-Tran, K.L., Osteen,
K.G., Tom, B.D., Fan, T.P., Smith, S.K., (2003):**
Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 88, 2889-2899.
- 52 **Hur, S.E., Lee, J.Y., Moon, H.S., Chung, H.W., (2006):**
Angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 expression in eutopic endometrium
in advanced endometriosis.
Mol. Hum. Reprod., 12(7), 421-6.
- 53 **Ingelmo, J.M., Quereda, F., Acién, P., (1999):**
Intraperitoneal and subcutaneous treatment of experimental endometriosis
with recombinant human interferon-alpha-2b in a murine model.
Fertil. Steril., 71(5), 907-1.
- 54 **Inui, H., Kondo, T., Konishi, F., Kitami, Y., Inagami, T., (1994):**
Participation of diacylglycerol kinase in mitogenic signal transduction
induced by platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 205(2), 1338-44.

-
- 55 **Iruela-Arispe, M.L., Porter, P., Bornstein, P., Sage, E.H., (1996):**
Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium.
J. Clin. Invest., 97(2), 403-12.
- 56 **Jahn, E., Classen-Linke, I., Kusche, M., Beier, H.M., Traub, O., Grümmer, R., Winterhager, E., (1995):**
Expression of gap junction connexins in the human endometrium throughout the menstrual cycle.
Hum. Reprod., 10, 2666-2670.
- 57 **Janeway, C.A. Jr., (2001):**
How the immune system protects the host from infection.
Microbes Infect., 3(13), 1167-71. Review.
- 58 **Jenkins, S., Olive, D.L., Haney, A.F., (1986):**
Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution.
Obstet. Gynecol., 67, 335-338.
- 59 **Jolicoeur, C., Boutouil, M., Drouin, R., Paradis, I., Lemay, A., Akoum, A., (1998):**
Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 in the endometrium of women with endometriosis.
Am. J. Pathol., 152(1), 125-33.
- 60 **Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V.W., Fang, G.H., Dumont, D., Breitman, M., Alitalo, K., (1995):**
Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 92(8), 3566-70.
- 61 **Kaufmann, S.H.E., (2007): Immunpathologie.**
In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF und Suerbaum S: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie,
6.Auflage; S. 99-107.
Berlin: Springer.
- 62 **Klagsbrun, M., D`Amore, P.A., (1991):**
Regulators of angiogenesis.
Annu. Rev. Physiol., 53, 217-39. Review.
- 63 **Kokorine, I., Nisolle, M., Donnez, J., Eeckhout, Y., Courtoy, P.J., Marbaix, E., (1997):**
Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions.
Fertil. Steril., 68(2), 246-51.
- 64 **Koninckx, P.R., Kennedy, S.H., Barlow, D.H., (1998):**
Endometriotic disease: The role of peritoneal fluid.
Hum. Reprod. Update, 4(5), 741-51. Review.

- 65 **Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Simopoulos, C., Gatter, K.C., Harris, A.L., Jackson, D.G., (2005):**
LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer.
J. Clin. Pathol., 58(2), 202-6.
- 66 **Lapp, T., (2000):**
ACOG issues recommendations for the management of endometriosis.
American College of Obstetricians and Gynecologists.
Am. Fam. Physician., 62(6), 1431-1434.
- 67 **Ledger, W.L., (1999):**
Endometriosis and infertility: an integrated approach.
Int. J. Gynaecol. Obstet., 64 Suppl 1, S33-40. Review.
- 68 **Leyendecker, G., Kunz, G., Noe, M., Herbertz, M., Mall, G., (1998):**
Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra.
Hum. Reprod. Update, 4(5), 752-62. Review.
- 69 **Lin, Y.J., Lai, M.D., Lei, H.Y., Wing, L.Y., (2006):**
Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model.
Endocrinology, 147(3), 1278-86.
- 70 **Maas, J.W., Groothuis, P.G., Dunselman, G.A., de Goeij, A.F., Struyker Boudier, H.A., Evers, J.L., (2001):**
Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle.
Hum. Reprod., 16(8), 1557-61.
- 71 **Maas, J.W., Groothuis, P.G., Dunselman, G.A., de Goeij, A.F., Struijker-Boudier, H.A., Evers, J.L., (2001):**
Development of endometriosis-like lesions after transplantation of human endometrial fragments onto the chick embryo chorioallantoic membrane.
Hum. Reprod., 16(4), 627-31.
- 72 **Machado, D.E., Abrao, M.S., Berardo, P.T., Takiya, C.M., Nasciutti, L.E., (2008):**
Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum.
Fertil. Steril., 90(1), 148-55.
- 73 **Malik, E., Meyhöfer-Malik, A., Berg, C., Böhm, W., Kunzi-Rapp, K., Diedrich, K., Rück, A., (2000):**
Fluorescence diagnosis of endometriosis on the chorioallantoic membrane using 5-aminolaevulinic acid.
Hum. Reprod., 15(3), 584-8.
- 74 **Matsuzaki, S., Canis, M., Murakami, T., Dechelotte, P., Bruhat, M.A., Okamura, K., (2001):**
Immunohistochemical analysis of the role of angiogenic status in the vasculature of peritoneal endometriosis.
Fertil. Steril., 76(4), 712-6.

-
- 75 **McLaren, J., Prentice, A., (1996):**
New aspects of pathogenesis of endometriosis.
Current Obstet. Gynaecol., 6, 85-91.
- 76 **Meyer, R., (1919):**
Über den Stand der Frage Adenomyositis und Adenomatome im allgemeinen
und insbesondere über Adenomyositis serosoepithelialis und
Adenomyometritis sarcomatosa.
Zbl. f. Gynäk., 43, 745-750.
- 77 **Mönckedieck, V., Sannecke, C., Husen, B., Kumbartski, M., Kimmig, R.,
Tötsch, M., Winterhager, E., Grümmer, R., (2009):**
Progestins inhibit expression of MMPs and of angiogenic factors in human
ectopic endometrial lesions in a mouse model.
Molecular Human Reproduction, 15(10), 633-643.
- 78 **Moghissi, K.S., (1999):**
Medical Treatment of Endometriosis.
Clin. Obstet. Gynecol., 42, 620-632.
- 79 **Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., Krepler, R., (1982):**
The Catalog of Human Cytokeratins: Patterns of expression in normal
epithelia, tumors and cultured cells.
Cell, 31, 11-24.
- 80 **Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S.,
Papaioannou, V.E., (1992):**
RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes.
Cell, 68(5), 869-77.
- 81 **Montagna, P., Capellino, S., Villaggio, B., Remorgida, V., Ragni, N., Cutolo,
M., Ferrero, S., (2008):**
Peritoneal fluid macrophages in endometriosis: correlation between the
expression of estrogen receptors and inflammation.
Fertil. Steril., 90(1), 156-64.
- 82 **Nap, A.W., Groothuis, P.G., Demir, A.Y., Maas, J.W., Dunselman, G.A., de
Goeij, A.F., Evers, J.L., (2003):**
Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in
the chicken chorioallantoic membrane.
Hum. Reprod., 18(1), 30-4.
- 83 **Nap, A.W., Dunselman, G.A., de Goeij, A.F., Evers, J.L., Groothuis, P.G.,
(2004):**
Inhibiting MMP activity prevents the development of endometriosis in the
chicken chorioallantoic membrane model.
Hum. Reprod., 19(10), 2180-7.
- 84 **Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Anaf, V., Mine, J.M., Donnez, J., (1993):**
Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal
endometriosis.
Fertil. Steril., 59, 681-684.

-
- 85 **Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Marbaix, E., Jadoul, P., Donnez, J., (2000) a:**
Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice.
Hum. Reprod., 15, 572-577.
- 86 **Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Donnez, J., (2000) b:**
Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual
endometrium in nude mice.
Fertil. Steril., 74, 306-312.
- 87 **Nisolle, M., Nervo, P., Blacher, S., Alvarez, M.I., Brichant, G., (2008):**
Angiogenesis and lymphangiogenesis.
Abstract: World Congress on Endometriosis (10th : 2008 : Melbourne,
Australia)
- 88 **Nowak, N.M., Fischer, O.M., Gust, T.C., Fuhrmann, U., Habenicht, U.F.,
Schmidt, A., (2008):**
Intraperitoneal inflammation decreases endometriosis in a mouse model.
Hum. Reprod., 23(11), 2466-74.
- 89 **Noyes, R.W., Hertig, A.T., Rock, J., (1975):**
Dating the endometrial biopsy.
Am. J. Obstet. Gynecol., 122(2), 262-3.
- 90 **Oakley, C.S., Welsch, M.A., Zhai, Y.F., Chang, C.C., Gould, M.N., Welsch,
C.W., (1993):**
Comparative abilities of athymic nude mice and severe combined immune
deficient (SCID) mice to accept transplants of induced rat mammary
carcinomas: enhanced transplantation efficiency of those rat mammary
carcinomas that have elevated expression of neu oncogene.
Int. J. Cancer, 53(6), 1002-7.
- 91 **Oberholzer, J., Toso, C., Ris, F., Bucher, P., Triponez, F., Demirag, A., Lou, J.,
Morel, P., (2001):**
Beta cell replacement for the treatment of diabetes.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 944, 373-87.
- 92 **Obermair, A., Preyer, O., Leodolter, S., (1999):**
Angiogenesis in Gynäkologie und Geburtshilfe.
Wien Klein. Wochenschr., 111, 262-277.
- 93 **Oosterlynck, D.J., Meulemann, C., Sobis, H., Vandeputte, M., Koninckx,
P.R., (1993):**
Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis.
Fertil. Steril., 59, 778-782.
- 94 **Ramey, J.W., Archer, D.F., (1993):**
Peritoneal fluid: its relevance to the development of endometriosis.
Fertil. Steril., 60(1), 1-14.

- 95 **Red-Horse, K., Rivera, J., Schanz, A., Zhou, Y., Winn, V., Kapidzic, M., Maltepe, E., Okazaki, K., Kochman, R., Vo, K.C., Giudice, L.C., Erlebacher, A., McCune, J.M., Stoddart, C.A., Fisher, S.J., (2006):**
Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation.
J. Clin. Invest., 116(10), 2643-52.
- 96 **Ridley, J.H., Edwards, I.K., (1958):**
Experimental endometriosis in the human.
Am. J. Obstet. Gynecol., 76, 783-790.
- 97 **Risau, W., (1997):**
Mechanisms of angiogenesis.
Nature, 386(6626), 671-4. Review.
- 98 **Rogers, P.A., Abberton, K.M., Susil, B., (1992):**
Endothelial cell migratory signal produced by human endometrium during the menstrual cycle.
Hum. Reprod., 7(8), 1061-6.
- 99 **Rogers, P.A., (2008):** Angiogenesis and endometriosis.
In: Rombauts L, Tsaltas J, Maher P, Healy D (Eds.) Endometriosis 2008.
S. 29-36. USA.
Blackwell Publishing.
- 100 **Rogers, P.A., Donoghue, J.F., Girling, J.E., (2008):**
Endometrial lymphangiogenesis.
Placenta, 29 Suppl A, S48-54.
- 101 **Rossi, G., Somigliana, E., Moschetta, M., Santorsola, R., Cozzolino, S., Filardo, P., Salmaso, A., Zingrillo, B., (2000):**
Dynamic aspects of endometriosis in a mouse model through analysis of implantation and progression.
Arch. Gynecol. Obstet., 263(3), 102-7.
- 102 **Russell, W.W., (1979):**
Aberrant portions of the Müllerian duct found in an ovary. Ovarian cysts of Müllerian origin.
Am. J. Obstet. Gynecol., 134(2), 225-6.
- 103 **Sadler, T.W., (2003):**
Medizinische Embryologie.
10.Auflage.
Stuttgart: Thieme.
- 104 **Saharinen, P., Tammela, T., Karkkainen, M.J., Alitalo, K., (2004):**
Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation.
Trends Immunol., 25(7), 387-95. Review.
- 105 **Salamanca, A., Beltran, E., (1995):**
Subendothelial contractibility in menstrual phase visualized by transvaginal sonography in patients with endometriosis.
Fertil Steril., 64, 193-195.

-
- 106 **Sampson, J.A., (1921):**
Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts in the ovary, their importance and especially their relation to pelvic adenomas of the endometrial type.
Arch. Surg., 3(2), 245-323.
- 107 **Sampson, J.A., (1927):**
Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of the endometrial tissue into the peritoneal cavity.
Am. J. Obstet. Gynecol., 14, 422.
- 108 **Schweppe, K.W., (1984):**
Morphologie und Klinik der Endometriose.
Stuttgart-New York:
Schattauer Verlag.
- 109 **Schweppe, K.W., Dmowski, W.P., Rolland, R., (1990):**
Endometriose: Pathophysiologie, Klinik und neue Behandlungsmöglichkeiten.
Frankfurt/Main:
Hoechst Verlag.
- 110 **Schweppe, K.W., (2002):**
Therapie der Endometriose unter Berücksichtigung der Aktivitätsgrade.
Gynäkologe, 35, 255-261.
- 111 **Schweppe KW (2003):**
The ranking of the gestagens in the treatment of pain caused by endometriosis-- an overview.
Zentralbl. Gynäkol., 125(7-8), 276-80. Review.
- 112 **Shaw, R.W., (1993):**
An atlas of endometriosis.
Carnforth, UK:
Parthenon Publishing Group.
- 113 **Shweiki, D., Itin, A., Neufeld, G., Gitay-Goren, H., Keshet, E., (1993):**
Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis.
J. Clin. Invest., 91, 2235 -2243.
- 114 **Siemann, D.W., Bibby, M.C., Dark, G.G., Dicker, A.P., Eskens, F.A., Horsman, M.R., Marmé, D., Lorusso, P.M., (2005):**
Differentiation and definition of vascular-targeted therapies.
Clin. Cancer Res., 11(2 Pt 1), 416-20. Review.
- 115 **Smith, S.K., (1998):**
Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium.
Hum. Reprod. Update, 4, 509-519.
- 116 **Somigliana, E., Viganò, P., Rossi, G., Carinelli, S., Vignali, M., Panina-Bordignon, P., (1999):**
Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis.
Hum. Reprod., 14(12), 2944-50.

-
- 117 **Story, L., Kennedy, S., (2004):**
Animal models in endometriosis.
ILAR J., 45, 132-138: A review.
- 118 **Tabibzadeh, S., Miller, S., Dodson, W.C., Satyaswaroop, P.G., (1999):**
An experimental Model for the Endometriosis in Athymic Mice.
Front. Biosci., 4, c4-9.
- 119 **Takehara, M., Ueda, M., Yamashita, Y., Terai, Y., Hung, Y.C., Ueki, M., (2004):**
Vascular endothelial growth factor A and C gene expression in endometriosis.
Hum. Pathol., 35(11), 1369-75.
- 120 **Taylor, R.N., Lebovic, D.I., Mueller, M.D., (2002):**
Angiogenic factors in endometriosis.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 955, 89-100; discussion 118, 396-406. Review.
- 121 **Thomas, E.J., Prentice, A., (1992):**
The aetiology and pathogenesis of endometriosis.
Reprod. Med. Rev., 1, 21-36.
- 122 **Torry, D.S., Torry, R.J., (1997):**
Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta.
Am. J. Reprod. Immunol., 37(1), 21-9. Review.
- 123 **Uchino, S., Ichikawa, S., Okubo, M., Nakamura, Y., Iimura, A., (1987):**
Methods of detection of lymphatics and their changes with oestrous cycle.
Int. Angiol., 6(3), 271-8.
- 124 **Ueki, M., (1991):**
Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus.
Am. J. Obstet. Gynecol., 165(1), 201-9.
- 125 **Ulrich, U., Hucke, J., Schweppe, K.W., (2005):**
Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie der Endometriose.
Zentralbl. Gynäkol., 127(5), 338-45.
- 126 **van der Linden, P.J.Q., de Goeij, A.F.P.M., Dunselmann, G.A.J., Erkens, H.W.H., Evers, J.L.H., (1996):**
Endometrial cell adhesion in an in vitro model using intact amniotic membranes.
Fertil. Steril., 65, 76-80.
- 127 **Van Langendonck, A., Donnez, J., Defrère, S., Dunselman, G.A., Groothuis, P.G., (2008):**
Antiangiogenic and vascular-disrupting agents in endometriosis: pitfalls and promises.
Mol. Hum. Reprod., 14(5), 259-68. 22. Review.

-
- 128 **Vercellini, P., Fedele, L., Aimi, G., Pietropaolo, G., Consonni, D., Crosignani, P.G., (2007):**
Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients.
Hum. Reprod., 22(1), 266-71.
- 129 **Vernon, M.W., Wilson, E.A., (1985):**
Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat.
Fertil. Steril., 44, 684-694.
- 130 **Vinatier, D., Dufour, P., Oosterlynck, D., (1996):**
Immunological aspects of endometriosis.
Hum Reprod. Update, 2(5), 371-84. Review.
- 131 **Vinatier, D., Cosson, M., Dufour, P., (2000):**
Is endometriosis an endometrial disease?
Eur. J. Gynecology Reprod. Biol. , 91, 113-125.
- 132 **Wingfield, M., Macpherson, A., Healy, D.L., Rogers, P.A.W., (1995):**
Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis.
Fertil. Steril., 64, 340-346.
- 133 **Witz C.A., Monotoya-Rodriguez, I.A., Schenken, R.S., (1999):**
Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion.
Fertil. Steril., 71, 56-60.
- 134 **Wortis, H.H., (1971):**
Immunological response of "nude" mice.
Clin. Exp.Immunol., 8, 305-317.
- 135 **Zamah, N.M., Dodson, M.G., Stephens, L.C., Buttram, V.C. Jr., Besch, B.K., Kaufman, R.H., (1984) :**
Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice.
Am. J. Obstet. Gynecol., 149, 591-597.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

1 Einleitung

Abbildung 1:

A: Schematische Darstellung der retrograden Menstruation. B: Endometriotische Läsionen und ihre Häufigkeit innerhalb der Peritonealhöhle (Schweppe, 1989) C: Laparoskopische Darstellung von peritonealen Endometrioseherden (Pfeile).

(http://www.frauenheilkund.insel.ch/uploads/pics/peritoneal_klein.jpg)

Abbildung 2:

Endometroide, von Blutgefäßen umgebene Läsion am Peritoneum.

2 Materialien und Methoden

Abbildung 3:

Agarosegel mit DNA-Proben nach erfolgter Elektrophorese. In der linken Tasche wurde die DNA-Leiter mit einer Größe von insgesamt 1000 Basenpaaren (bp) zum Größenvergleich aufgetragen. Die am weitesten gelaufene Bande entspricht dabei einer Größe von 100 bp. Die Abstände der einzelnen Banden betragen jeweils 100 bp. In den anderen Kammern sind jeweils die analysierten DNA-Proben zu sehen. Dabei entspricht eine doppelte Bande einem heterozygotem Genotyp, eine Bande bei circa 400 Basenpaaren weist auf einen für das Rag-1-KO-Gen homozygoten Genotyp hin und eine Bande bei circa 200 Basenpaaren charakterisiert einen Wildtyp.

3 Ergebnisse

Abbildung 4:

Makroskopisches Erscheinungsbild von in die Nacktmaus transplantiertem humanem endometrialem Gewebe.

A) Subkutan implantiertes Endometriumsfragment nach zwölfwöchiger Kultur.

B) Intraperitoneal implantiertes Fragment nach vierwöchiger Kultur.

Abbildung 5A - F:

Wiederfindungsraten der subkutan (A, C, E) und intraperitoneal (B, D, F) implantierten endometrialen Läsionen nach vier, acht und zwölf Wochen der Kultur;

A, B: Makroskopisch wiedergefundene endometriale Läsionen.

C, D: Wiederfindungsraten der rein histologisch detektierten endometrialen Läsionen.

E, F: Summe der sowohl makroskopisch als auch rein histologisch detektierten endometrialen Läsionen.

Abbildung 6:

Größe der subkutan (A) und intraperitoneal (B) transplantierten endometrialen Läsionen nach vier, acht und zwölf Wochen der Kultur.

100 % = Größe des Fragmentes zum Zeitpunkt der Implantation.

Abbildung 7:

Frisch entnommenes endometriales Gewebe aus der späten Proliferationsphase des Menstruationszyklus vor der Transplantation.

Abbildung 8:

Histomorphologie der subkutan (A - F) und intraperitoneal (G - L) implantierten und über vier (A, B, G, H), acht (C, D, I, J) und zwölf (E, F, K, L) Wochen kultivierten endometrialen Läsionen in Rag-1^{-/-} und Nacktmaus. (A, E: Toulidinblau-Färbung; B - D und F - L: Hämatoxilin-Eosin-Färbung).

Abbildung 9:

Intraperitoneal implantiertes endometriales Fragment nach achtwöchiger Kultur in der Rag-1^{-/-}-Maus und Hämatoxilin-Eosin-Färbung. Zu erkennen ist die Adhäsion und Invasion des humanen Transplantats am murinen Muskelgewebe.

Abbildung 10:

Färbung der Mausendothelien mit DAB nach Inkubation mit dem anti-Maus-CD31-Antikörper.

A, B: Endometriumfragment nach vierwöchiger intraperitonealer Kultur in der Rag-1^{-/-}-Maus. Man erkennt einsprossende Gefäße sowohl in der Adhäsionszone zwischen Mausgewebe und humanem Gewebe (B, Pfeil) als auch weit in die Läsion eingewachsen (B, Pfeilspitze). A = Toulidinblaugefärbter Parallelschnitt zu B.

C, D: Auch nach subkutaner Implantation wachsen Wirtsgefäße in die humanen Läsionen ein, hier nach achtwöchiger Kultur in der Nacktmaus (D, Pfeil). C = Toulidinblaugefärbter Parallelschnitt zu D.

E, F: Vergrößerte Darstellung der Endometriumfragmente nach achtwöchiger subkutaner Kultur in der Nacktmaus (F: mit Toulidinblau gegengefärbt). Deutlich zu erkennen sind die interglandulär (E: Pfeile) und ins endometriale Stroma (F: Pfeile) eingewachsenen murinen Gefäße.

Abbildung 11:

Subkutane (A) und intraperitoneale (B) Hämangiogenese nach vierwöchiger Kultur in der Nacktmaus mit Darstellung der durch Perizyten stabilisierten Gefäße unter Verwendung des alpha-smooth-muscle-actin-Antikörpers.

Abbildung 12:

Hämangiogenese: Durchschnittliche Anzahl CD31- (A, B) und α -SMA (C, D) positiver Gefäßanschnitte/mm² nach subkutaner (A, C) und intraperitonealer (B, D) Kultur über vier, acht und zwölf Wochen in der Rag-1^{-/-}-Maus und Nacktmaus.

Abbildung 13:

Hämangiogenese beider Mausstämme zusammengefasst: Durchschnittliche Anzahl CD31- (A) und α -SMA (B) positiver Gefäßanschnitte/mm² nach subkutaner und intraperitonealer Kultur über vier, acht und zwölf Wochen. * = $p \leq 0,01$.

Abbildung 14:

Lymphangiogenese der subkutan (A, C) und intraperitoneal (B, D) implantierten endometrialen Läsionen in Rag-1^{-/-} (C, D) und Nacktmaus (A, B) nach vier- (A, B) und zwölfwöchiger (C, D) Kultur und Behandlung mit dem Lyve-1-Antikörper, sowie einer Gegenfärbung mit Toulidin-Blau.

Abbildung 15:

Lymphangiogenese: Durchschnittliche Anzahl Lyve-1 positiver Gefäße pro Flächeneinheit nach subkutaner (A) und intraperitonealer (B) Kultur über vier, acht und zwölf Wochen in der Rag-1^{-/-}-Maus und Nacktmaus.

Abbildung 16:

Lymphangiogenese beider Mausstämme zusammengefasst: Durchschnittliche Anzahl Lyve-1 positiver Gefäße pro Flächeneinheit nach subkutaner und intraperitonealer Kultur über vier, acht und zwölf Wochen. * = $p \leq 0,05$.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	alpha-smooth-muscle-actin
BP	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumine
CD	Cluster of differentiation
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5`Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
HCL	Salzsäure
i.p.	intraperitoneal
KO	Knockout
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
mm	Millimeter
NK	Natürliche Killerzellen
PAN	Panendothelial
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Rag	Recombinase Activating Gene
s.c.	subkutan
TBE	Tris-Base, Borsäure, EDTA
VDA	Vascular Disrupting Agent
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp

8 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei Allen bedanken, die zu einem erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich intensiv unterstützt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ruth Grümmer und bei Frau Prof. Dr. Elke Winterhager für die Bereitstellung und Überlassung des interessanten Themas sowie der Möglichkeit der wiederholten Teilnahme an der Chiemsee-Konferenz.

Frau Prof. Dr. Ruth Grümmer gilt mein ganz besonderer Dank. Durch ihre unzähligen fachkundigen und kostbaren Ratschläge sowie ihren jederzeit ausdauernden Einsatz habe ich eine hervorragende Betreuung genossen und zu meiner Freude am wissenschaftlichen Arbeiten viele wertvolle Erfahrungen gewonnen. Besonders unser Treffen in Australien im Rahmen des Endometriose-Weltkongresses sowie das Arbeitskreistreffen auf der Margarethenhöhe werden mir immer in schöner Erinnerung bleiben.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Georgia Rauter und Frau Ulrike Tlolka aus dem Institut für Anatomie. Ihre tatkräftige Hilfe sowie ihre zahlreichen Tipps im Histo-Labor haben entscheidend zu den Ergebnissen meiner Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Verena Mönckedieck danke ich herzlich für ihre Unterstützung beim praktischen Teil sowie für zahlreiche Tipps für die Zusammenstellung der Arbeit.

Ich möchte mich herzlich bei Frau Dr. Isabella Gashaw für ihre anregenden Ideen und ihre fruchtbare Unterstützung zur Entwicklung meiner Arbeit bedanken.

Frau Dr. Sabine Firnhaber danke ich herzlich für ihre Hilfestellungen und Ratschläge bei den ersten Schritten des Operierens.

Für die Überlassung der humanen Gewebeproben bedanke ich mich sehr bei dem Team der Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rainer Kimmig.

Ein großer Dank gilt Carolin Sannecke, Dr. Betina van Fürden, Jessica Wagener, Stefanie Hardt, Dr. Alexandra Gellhaus, Ann-Kathrin Bittner, Yvonne Koch, Melanie Gemein, Kathrin Kazuschke, Nadine Wolf, Dr. Tina Graevendiek und der gesamten Arbeitsgruppe sowie meinen ehemaligen Kolleginnen aus der Anatomie für ihre stetige Hilfsbereitschaft und zahlreiche schöne und unvergessliche Momente.

Mein ganz besonders großer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Großeltern, Maxi, Cornelia und Peter sowie meinen Freunden, die mich in jeder Situation intensiv unterstützt und gefördert haben und somit diese Arbeit ermöglicht haben.

9 Lebenslauf

Name	Linda Söhngen
Geburtsdatum	19.05.1984
Geburtsort	Duisburg-Huckingen
Eltern	Rolf Söhngen, Studiendirektor Dagmar Söhngen, geb. Sareyko, Diplom-Ökonomin
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbildung	1990-1994 Gemeinschafts-Grundschule Am Knappert, Duisburg-Rahm 1994-2003 Theodor-Fliedner-Gymnasium, Düsseldorf- Kaiserswerth
Schulabschluss	2003 Abitur
Studium	2003-2009 Studium der Humanmedizin an der Universität Duisburg-Essen
Studienabschluss	2009 Staatsexamen Medizin
Beschäftigungen	2005 bis 2008 wiederholte Tätigkeit als studentische Hilfskraft im Institut für Anatomie und Institut für Molekularbiologie des Universitätsklinikums Essen, 2006 bis 2008 studentische Hilfskraft in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen
Dissertation	2005 bis März 2008 im Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen, seit April 2008 im Institut für Molekularbiologie des Universitätsklinikums Essen